

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation de la réponse hypersensible des cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension traitées par des Chitooligosaccharides et Oligogalacturonide

Delhaes, Anne-Florence

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HYPERSENSIBLE DES CELLULES
D'Arabidopsis thaliana EN SUSPENSION TRAITÉES PAR DES
CHITOOLOGOSACCHARIDES ET DES OLIGOGALACTURONIDES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Anne-Florence DELHAES

Janvier 2009



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE HYPERSENSIBLE DES CELLULES
D'Arabidopsis thaliana EN SUSPENSION TRAITÉES PAR DES
CHITOOLOGOSACCHARIDES ET DES OLIGOGALACTURONIDES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Anne-Florence DELHAES

Janvier 2009

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Caractérisation de la réponse hypersensible des cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension traitées par des Chitooligosaccharides et Oligogalacturonides

DELHAES Anne-Florence

Résumé

Les plantes représentent une source de carbone pour les agents pathogènes microbiens. Etant immobiles et soumises aux modifications environnementales sans possibilité de s'y soustraire, elles doivent se défendre en permanence contre leurs agresseurs. Comme les végétaux ne possèdent pas de cellules de défense spécialisées, ils ont développé un système de défense permettant à chaque cellule de se défendre elle-même. La défense est précédée par une étape de perception de motifs moléculaires conservés et associés à une attaque pathogène, les PAMP. Parmi les PAMP, des éliciteurs oligogalacturoniques dont certains sont capables d'induire la mort cellulaire, dans le cadre de la réaction d'hypersensibilité.

Un type d'éliciteur induisant les réponses de défense dans les cellules végétales sont des PAMP. La réponse hypersensible, partie intégrante des systèmes de défense chez les végétaux, est une réponse complexe et relativement mal caractérisée. La caractérisation de certaines manifestations clé de la réponse hypersensible chez des cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*, suite à un traitement par un éliciteur oligosaccharidique constitue le but de ce travail. L'effet de différentes concentrations en éliciteurs ont été évaluées. Les éliciteurs analysés dans notre travail sont des chitooligosaccharides, des oligogalacturonides et un mélange de ceux-ci dans un rapport 1/1. Les paramètres testés sont le pH du milieu d'incubation, l'efflux de potassium, la production d'eau oxygénée, l'activité de la caspase-like DEVD et la fragmentation internucléaire de l'ADN. Nous avons observé une variation de l'importance des paramètres mesurés, en fonction des éliciteurs et des concentrations utilisées.

Mémoire de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: P. Van Cutsem

Remerciements

Je remercie Monsieur Van Cutsem pour sa patience et sa compréhension durant la correction de mon mémoire et pour son soutien pendant l'évaluation des résultats des expériences.

Je remercie Monsieur Messiaen de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et tout l'URBV de m'avoir intégrée dans leur équipe.

Je remercie Pierre pour son soutien dynamique pendant les nombreuses expériences et Raffael pour l'approvisionnement permanent des chitosans.

Je remercie Françoise pour les dernières modifications de se manuscrit.

Je remercie Juan-Carlos pour les nombreuses explications, les corrections et les protocoles qu'il m'a donnés et Sophie, Stéphanie et Boris pour tous les moments amusants qu'on a passés ensemble et pour toutes leurs corrections urgentes.

Je remercie les sœurs de Notre Dame pour leur soutien moral unique et dynamique aux moments où j'en avais besoin.

Und natürlich bedanke ich mich bei meiner Familie und bei Dieter, ohne deren jahrelange Unterstützung und Aufmunterung, in allen meinen Panik-Momenten, ich es wahrscheinlich nicht bis hier her geschafft hätte.

Abréviations

PAMP : signature moléculaire associé au pathogènes
EF : facteurs d'élongation
MAMP : signature moléculaire associé aux microbes
PPR : Pattern Recognition Receptors
MAPKinases : Mitogen-activated protéine kinases
PR-protéines : Protéines reliées aux pathogènes
ROS : Reactive Oxygen Species
PTI : l'immunité induite par des signaux PAMP
ETS : susceptibilité induite par les effecteurs
ETI : l'immunité induit par les effecteurs
Gènes R : gènes de résistance
RLP's: protéines "receptor-like"
RLK's : kinases "receptor-like"
LRR : Répétitions Riches en Leucines
TIR-NB-LRR : Toll-interleukin-1 receptor nucleotide-binding site leucine rich repeat
CC-NB-LRR: coiled-coil nucleotide-binding site leucine rich repeat
HR : Réponse Hypersensible
SAR : Résistance Systémique Acquise
NO : Oxyde nitrique
PMA : ATPase des protons de la membrane plasmique
ATP : Adénosine tris phosphate
NAD(P)H-oxydase
Caspase : Cystéines ASpartate ProtéASES
kDa : kilo Dalton
VPEs : Vacuolar processing enzyme
ADN : acide désoxyribonucléique
Kb : Kilobase
TMV : virus mosaïque du tabac
SA : acide salicylique
JA : acide jasmonique
CEBiP : protéine liant l'élévateur chitine
OGA : oligogalacturonides
COS : chitooligosaccharides
DP : Degré de polymérisation élevé
GalpA : 1,4 α -D-acides galactosylurionique
HGs : homogalacturonans
RGs-1 : rhamnogalacturonans de types 1
RGs-2 : rhamnogalacturonans de types 2
TTC : 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
ppm : parts per million
MSMO : Murashige and Skoog basal salt with minimal organics
MES : 2(N_Morpholino)ethanesulfonic acid
PARP : poly-(ADN-ribose) polymérase
EPGases : endopolygalacturonases
ePLases : endopectates lysases

Table des Matières

Introduction.....1-18

1) Introduction.....1

2) Le système immunitaire.....1

2.1 Défense passive

2.1.1 La paroi cellulaire

2.1.2 Les voies de pénétration

2.2 Défense active

2.2.1 Défense basale

2.2.1.1 Reconnaissance des pathogènes

2.2.1.2 Le modèle Zigzag

2.2.2 Défense médiée par des gènes de résistance

2.2.2.1 Les modèles de reconnaissance par les protéines des gènes R

2.2.2.2 La réponse hypersensible

2.2.2.2.1 Mécanismes étudiés lors de cette étude

2.2.2.2.1.1 Réponses membranaires

- Alcalinisation du milieu extracellulaire
- Concentration potassique
- Concentration en peroxyde d'hydrogène

2.2.2.2.1.2 Manifestations de mort cellulaires « apoptotic-like »

- Activités « caspase-like »
- Fragmentation nucléaire

2.2.2.3 La résistance systémique acquise

3) Les éliciteurs.....11

3.1 Elicitation par des chitosans

3.1.1 Structure des chitosans

3.1.2 Perception et reconnaissance des chitosans

3.1.3 Bioactivité des chitosans

3.1.4 Perspectives d'utilisation des chitosans

3.2 Elicitation par des oligogalacturonides

3.2.1 La pectine

3.2.2 Les oligogalacturonides (OGA)

3.2.3 Les réponses de défense induites par les oligogalacturonides (OGA)

3.3 Interaction entre chitosans et pectine

4) Modèle cellulaire d'étude.....17

5) Objectifs.....18

Matériel et Méthodes.....19-27

1) Culture cellulaire.....19

1.1 Repiquage de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension

2) Stimulation cellulaire.....19

2.1 Chauffage des cellules

2.3 Elicitation des cellules

3) Dosages du pH, de l' H_2O_2 et du K^+ dans le surnageant.....20

3.1 Lecture du pH

3.2 Dosage du H_2O_2

3.3 Dosage du K^+

4) Mise en évidence de la mort cellulaire après stimulation....22

4.1 Test de viabilité 2,3,5-Triphényltétrazolium chloride (TTC)

4.2 Dépigmentation, lyse cellulaire et extraction protéique

4.3 Dosage protéique par la méthode de Bradford

4.4 Dosage de l'activité caspase 3-like

4.4.1 Dosage de la caspase-3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-pNA (Caspase 3 Colorimetric Activity Assay Kit, DEVD, Chemicon)

4.4.2 Dosage de la caspase-3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen)

4.5 Extraction d'ADN et migration sur gel d'agarose de « lowmelting » à 2%

4.5.1 Extraction d'ADN

4.5.2 Migration sur gel d'agarose « low melting » 2%

Résultats et Discussion.....28-46

1) <u>Mise au point d'un contrôle positif de l'activité caspase-like pendant la réponse hypersensible chez des cellules d'<i>Arabidopsis thaliana</i> en suspension.....</u>	28
<i>1.1 Mise au point du dosage de l'activité caspase 3-like</i>	
<i>1.1.1 Dosage de l'activité caspase 3-like grâce au substrat colorimétrique, Ac-DEVD pNA</i>	
<i>1.1.2 Dosage de l'activité caspase 3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC</i>	
2) <u>Caractérisation de la réponse hypersensible de cellules d'<i>Arabidopsis thaliana</i> en suspension traitées avec des éliciteurs.....</u>	31
<i>2.1 Dosage de la viabilité cellulaire après un traitement aux éliciteurs</i>	
<i>2.2 Mesure du pH</i>	
<i>2.3 Mesure de la concentration en potassium libéré par les cellules élicitées</i>	
<i>2.4 Mesure de H₂O₂</i>	
<i>2.5 Dosage protéique par Bradford</i>	
<i>2.6 Dosage de l'activité caspase 3-like</i>	
<i>2.7 Dégradation de l'ADN</i>	
3) <u>Discussion.....</u>	44
 Conclusions et perspectives.....	47-48
 Bibliographie.....	49-55

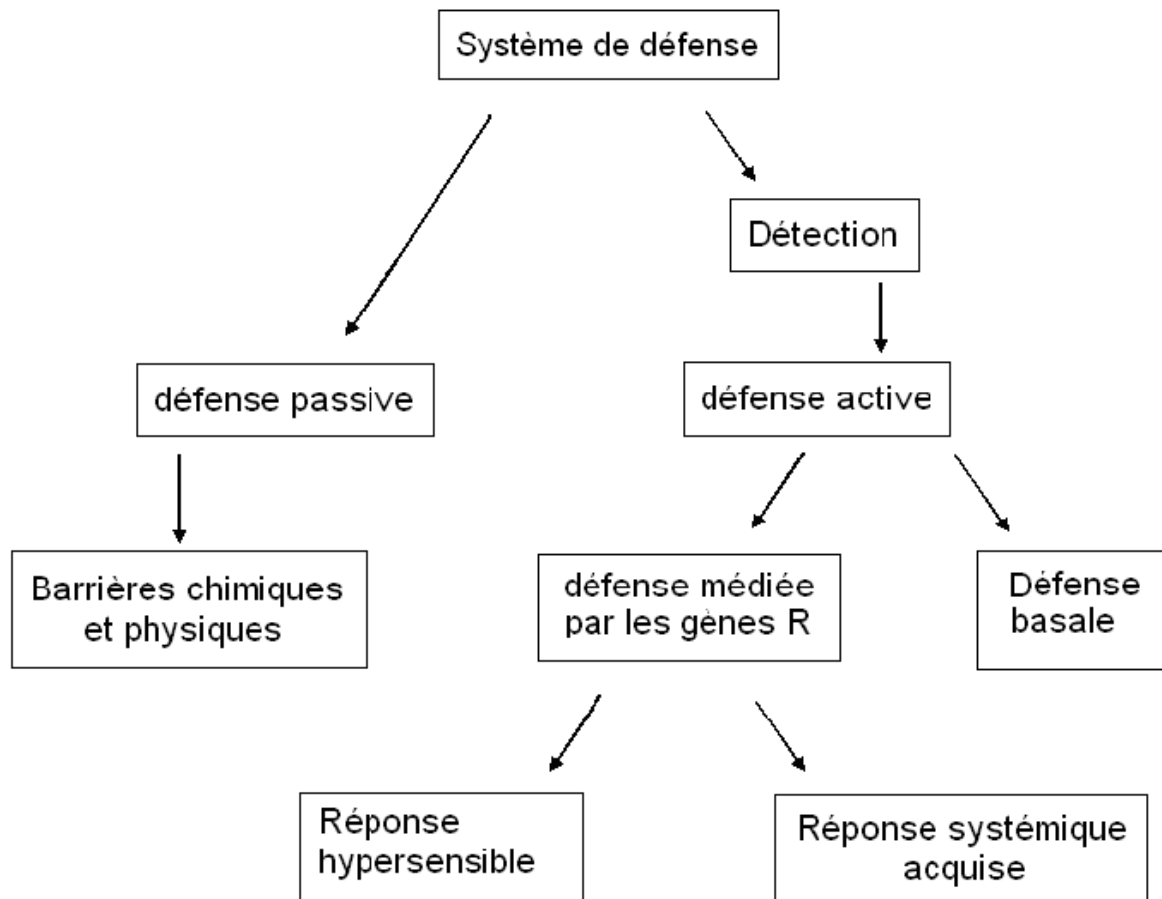


Figure 1 : diagramme du système de défense des cellules végétales

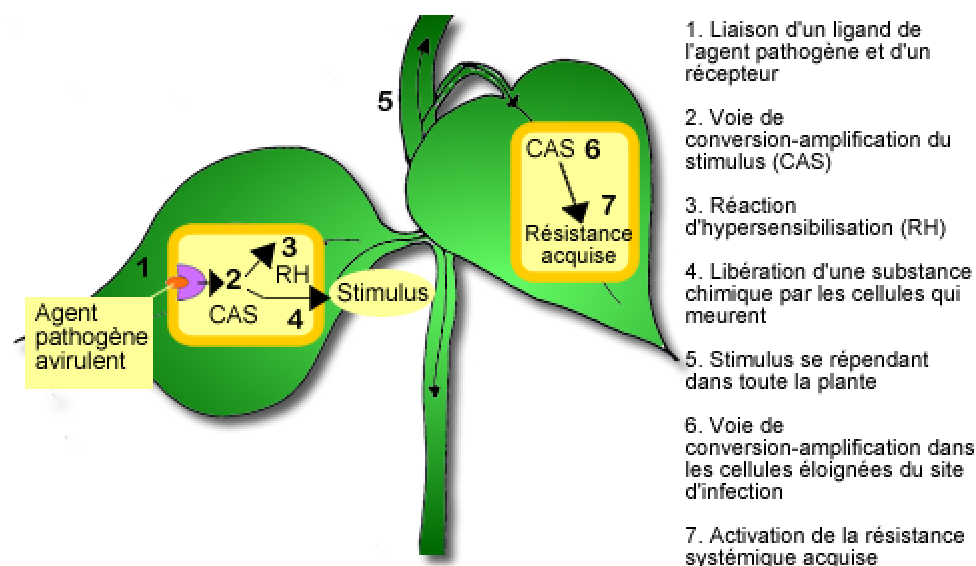


Figure 2 : Evolution d'une réponse de défense de la plante suite à la perception d'un agresseur

1) Introduction

Les plantes représentent une source de carbone pour les agents pathogènes microbiens. Les plantes étant immobiles, elles subissent les modifications environnementales et doivent donc se défendre en permanence contre leurs agresseurs. (Chisholm *et al.*, 2006), au contraire des animaux qui peuvent, dans une certaine mesure, éviter un stress en fuyant. Par ailleurs les animaux possèdent tous un système immunitaire inné et acquis qui protège l'organisme contre les agressions.

Comme les végétaux ne possèdent pas de cellules de défense spécialisées, les plantes ont développé un système de défense permettant à chaque cellule de se défendre elle-même (Figure 1). Pour cela, les plantes sont capables de percevoir la présence d'un pathogène et de lancer la réponse de défense au niveau de chaque cellule. Avant d'être détectés, les pathogènes doivent surmonter le système de défense passif, constitué de barrières chimiques et physiques constitutives, qui empêchent l'infection (Nürberger T., 2004). La détection est une étape cruciale de la défense active contre un pathogène (Figure 2). La défense active, induite par la détection du pathogène, peut être subdivisée en deux branches. La première est la défense basale et la deuxième est la défense médiée par des gènes de résistance jusqu'à, il y a peu, appelés gènes R. La défense médiée par les gènes R peut elle-même être subdivisée en deux : la réponse hypersensible qui s'occupe de la défense locale en tuant la cellule attaquée et la réponse systémique acquise au niveau de la plante entière (Hofius *et al.*, 2007).

2) Le système immunitaire

2.1 Défense passive

La défense passive est constituée de barrières chimiques et physiques constitutives, telles que la paroi cellulaire, les trichomes, les couches cuticulaires et cireuses et des composés endogènes toxiques qui empêchent l'infection. Ces composés endogènes sont souvent des métabolites secondaires, des composés organiques variés ne participant pas directement à la croissance ou au développement cellulaire (par ex : ac. phénoliques-chlorogénique, alcaloïdes-nicotine...) et servant alors pour la défense contre des pathogènes (da Cuna *et al.*, 2006).

2.1.1 La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle détermine la taille et la forme de la cellule en limitant la croissance du protoplaste. La paroi cellulaire joue un rôle important et actif dans la sécrétion des substances, l'absorption et le transport. La paroi est composée essentiellement de cellulose. Les polymères de cellulose s'associent pour former des microfibrilles ; celles-ci s'enroulent ensemble pour former de minces filaments. Ce réseau de filaments composés de cellulose est intégré dans une matrice de protéines de structure comme les glycoprotéines et de polysaccharides d'hémicellulose et de pectines. L'hémicellulose est liée par des liaisons d'hydrogène aux microfibrilles de cellulose et joue un rôle important dans le contrôle de la taille de la cellule. Les pectines sont des polysaccharides très hydrophiles contenant de l'acide galacturonique. Des glycoprotéines, de la lignine et des substances lipidiques sont aussi présentes dans la paroi.

La paroi est composée de trois parties, la **lamelle moyenne**, qui constitue la partie de la paroi la plus distale de la membrane. Elle est constituée principalement de matière pectique et est commune à deux cellules contiguës. La couche suivante est la **paroi primaire**, composée de deux, parfois trois réseaux structurellement indépendants, mais interagissant entre eux. La paroi primaire est constituée de cellulose, hémicellulose, substances pectiques, protéines et d'eau. La lignine, la subérine et la cutine peuvent également se localiser au niveau de la paroi primaire. Elle se met en place avant et pendant la croissance de la cellule et est extensible, ce qui permet la croissance cellulaire. La dernière couche, se situant entre la paroi primaire et le plasmalemme est la **paroi secondaire**. Elle est constituée particulièrement de cellulose et d'hémicellulose, et la pectine n'est pas nécessairement présente. La paroi secondaire est enrichie en composés phénoliques : lignine (pour renforcer la rigidité), cutine et subérine (pour l'imperméabiliser). Cette différenciation s'observe pour les cellules conductrices de sève du xylème (le bois) et pour différents tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège).

Pour permettre les communications entre cellules, directement de cytoplasme à cytoplasme, les parois sont finement ponctuées de **plasmodesmes** (Raven et al. 2007)

2.1.2 Les voies de pénétration

Pour infecter une plante, un agent pathogène doit d'abord surmonter les barrières physiques et chimiques de la plante, puis contourner les mécanismes de défense inductibles. En effet, l'issue de la confrontation entre l'agent pathogène et la plante dépend de la capacité de cette dernière à percevoir le pathogène, puis à déclencher des réactions de défense, afin d'empêcher le développement de la maladie.

L'entrée des pathogènes dans la plante diffère fortement selon l'origine du pathogène. Par exemple, les bactéries pathogéniques essayent d'entrer par les pores de l'eau, du gaz et par des blessures ouvertes. Une fois entré, ils prolifèrent vers des espaces intercellulaires comme l'apoplaste. Les nématodes et les pucerons entrent en insérant un stylet directement à l'intérieur de la cellule. Les champignons entrent, soit directement dans les cellules épidermiques, soit à l'aide d'un hyphe qui entre dans les cellules végétales de la plante ou bien entre elles (Jones and Dangl, 2006).

2.2. Défense active

Une fois que les pathogènes ont pénétré les barrières passives de la cellule, ils essayent d'infecter la cellule entière. Les mécanismes de défense actifs permettent de moduler rapidement les activités des cellules infectées afin qu'elles puissent défendre efficacement l'ensemble de la plante en empêchant le pathogène de progresser. En cas d'infection, des changements transcriptionnels sont associés aux défenses basales et aux défenses médiées par les gènes de résistance.

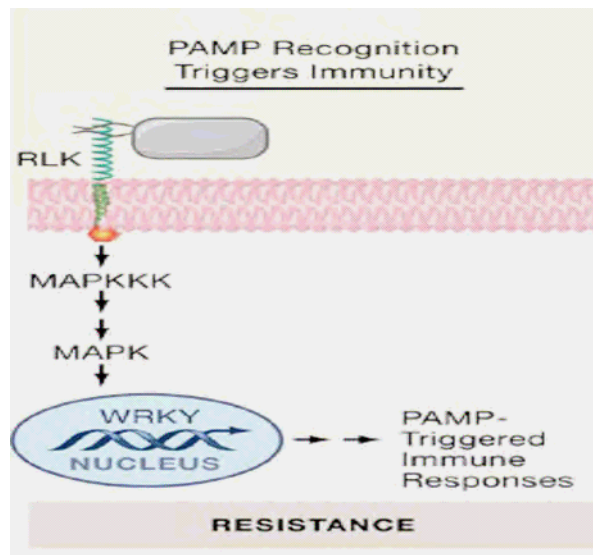


Figure 3 : Reconnaissance d'un PAMP du pathogène par un récepteur et voie de transduction du signal général

TABLE 1. <i>The families of pathogenesis-related proteins^a</i>			
Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I, II IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor 1	proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pm</i> ')
PR-7	Tomato <i>P_{mo}</i>	endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco class V chitinase	chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i> TH12.1	thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>

Figure 4 : Liste des différentes familles de protéines PR découvertes jusqu'au 1999 chez différents plantes modèles

2.2.1. *Défense basale*

2.2.1.1. Reconnaissance des pathogènes

Suivant le type d'infection, la plante réagit différemment. Si elle n'identifie pas le pathogène, la maladie se développe et la plante finit souvent par mourir. Cette réponse est appelée « interaction compatible ». Par contre, si la plante reconnaît le pathogène, toute une succession de processus est mise en place afin de contrer l'infection. Ce processus est aussi connu sous le nom « d'interaction incompatible ». La troisième possibilité est « l'interaction non-hôte », ce nom décrit le fait que le pathogène ne peut même pas pénétrer les barrières passives de la plante (Nürberger T., 2004).

Ces processus sont activés par des signatures moléculaires conservées par l'évolution (PAMP-Pathogen-Associated Molecular Patterns) et spécifiques à chaque pathogène. Les PAMPs, comme la flagelline, le peptidoglycane, des facteurs d'élongation (EF-tu), et des lipopolysaccharides des bactéries Gram-, de la chitine et de l'ergostérol des champignons sont des structures hautement conservées au cours de l'évolution et nécessaires pour la survie du pathogène (Zipfel 2008). Actuellement, les PAMPs sont nommés MAMP's (Microbe-Associated Molecular Patterns) ces signatures moléculaires existant aussi bien en situation normale que pathogénique (Bittel et Robatzek, 2007).

La reconnaissance du pathogène fait partie de la défense basale ; elle correspond à la veille du non-soi. La reconnaissance se fait 10 à 30 minutes après l'interaction plante-pathogène (Jones and Dangl, 2006). Plus spécifiquement, la défense basale est une reconnaissance des PAMP du pathogène via les PPR (Pattern Recognition Receptors) de la plante. Les PPR sont des protéines « sentinelles » à différents niveaux de la plante ; par exemple, dans l'apoplasme, la paroi et la membrane cellulaire. Ces protéines possèdent une grande affinité pour les PAMP du pathogène afin que ce dernier soit détecté même à faible concentration (Jones and Dangl, 2006).

La liaison PAMP/PPR permet d'activer la réponse de défense de la plante qui démarre les cascades d'amplification du signal par phosphorylation de MAPKinases (cascade des MAPKinases) aboutissant à la transcription de gènes de résistance impliqués dans la défense de la plante (Figure 3). La transcription des gènes liés aux pathogènes va conduire à la production de nouveaux composés tels que les PR-protéines (Pathogenesis Related) dirigées contre le pathogène (chitinases, glucanases, protéines inhibitrices de polygalacturonases...), l'accumulation de composés antimicrobiens (phytoalexines, ROS,...) et un dépôt rapide de callose pour incruster la paroi. Les protéines PR (Figure 4) ont des propriétés physico-chimiques spécifiques : elles sont très stables en milieu acide et résistent à l'action des protéases de la plante même ou celles des micro-organismes pathogènes. Leur grande stabilité dans des environnements défavorables permet de les accumuler dans la vacuole et dans les espaces intercellulaires occupés par les agents pathogènes. Les produits de dégradation de ces PR-protéines peuvent constituer des PAMP pour les cellules de la plante attaquée.

Cependant, pour échapper à la réponse de défense et coloniser la plante, certains pathogènes contrent cette cascade en injectant des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte pour court-circuiter divers échelons de la cascade de signalisation (Chrisholm et al, 2006).

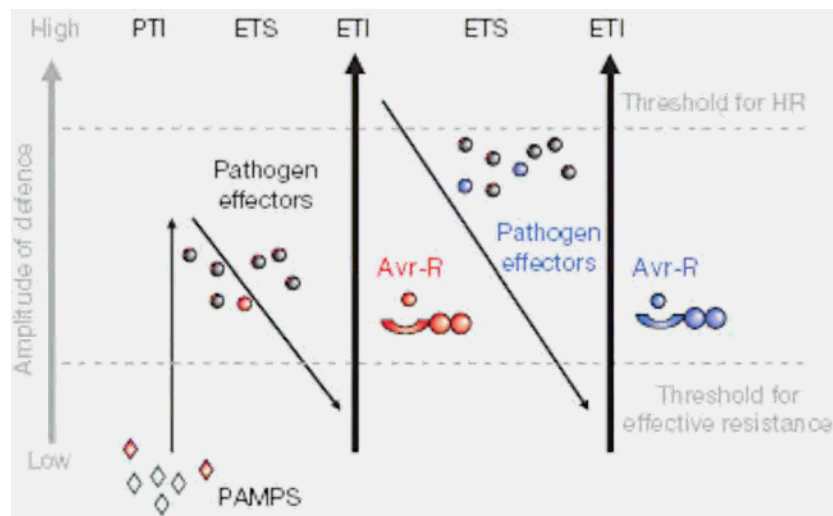


Figure 5: Modèle « Zig-Zag » proposé par Jones et Dangl en 2006 , expliquant les mécanismes de réponses causés par la détection d'un pathogène. Le modèle « Zig-Zag » est divisé en quatre phases, l'immunité induite par des signaux PAMP (PTI- Pamp triggered immunity), ETS (effector-triggered susceptibility), l'immunité induite par les effecteurs (ETI-effector triggered immunity) et à nouveau l'ETS (effector-triggered susceptibility).

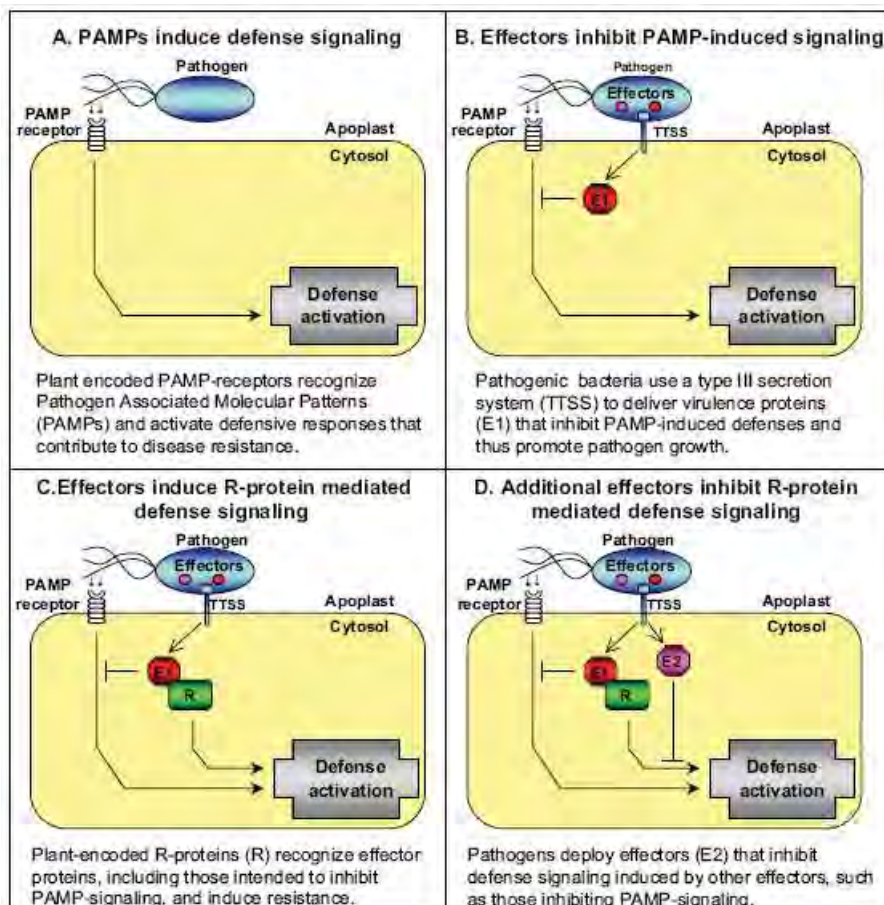


Fig. 1. Hypothetical evolution of layered defenses.

Figure 6 : Mécanismes de reconnaissance d'un pathogène par une plante et réponses à cette attaque

2.2.1.2. Le modèle Zigzag

Pour expliquer le mécanisme de détection du pathogène, l'induction de la réponse basale par la plante et la réaction du pathogène suite à cette réponse, Jones et Dangl ont proposé un modèle « zigzag » en 2006 (Figure 5 et 6). Ce modèle « zigzag » est divisé en quatre phases : l'immunité induite par des signaux PAMP (PTI- Pamp Triggered Immunity), susceptibilité induite par les effecteurs (ETS-Effector-Triggered Susceptibility), l'immunité induite par les effecteurs (ETI-Effector Triggered Immunity) et à nouveau la susceptibilité induite par les effecteurs (ETS-Effector-Triggered Susceptibility).

Phase 1 : PTI: PAMP-triggered immunity

Pour arrêter la colonisation par les pathogènes, les cellules végétales déclenchent la PTI. Le déclenchement des PTI se fait en détectant les PAMP des pathogènes par des PRR (Pattern Recognition Receptors) localisés à différents niveaux des cellules végétales (Figure 5).

Phase 2 : ETS : effector-triggered susceptibility

Quelques pathogènes ne sont pas arrêtés par la première phase et vont injecter des effecteurs, lesquels vont interférer avec la PTI. Ces effecteurs vont favoriser la virulence du pathogène (Figure 5).

Phase 3 : ETI : effector-triggered immunity

Un des effecteurs pathogénique est spécifiquement reconnu par une des protéines encodées par les gènes de résistance (gènes R) ou bien par une reconnaissance indirecte, ce qui va aboutir à une ETI. Les effecteurs pathogéniques reconnus par la plante sont appelés « protéines d'avirulence » (avr) (Figure 5). ETI est une version accélérée et plus forte de PTI qui aboutit souvent, mais pas nécessairement, à une réponse hypersensible (mort cellulaire). Une fois que les gènes R interviennent dans la réponse, les mécanismes n'appartiennent plus à la réponse basal, mais à la réponse médiée par les gènes R.

Phase 4 : ETS-ETI

La sélection naturelle pousse les pathogènes à perdre leurs effecteurs ciblés par la plante (Figure 5 : effecteur en rouge) et de favoriser un nouvel effecteur (effecteur en bleu) pour éviter l'ETI. En même temp, la sélection naturelle favorise les plantes possédant de nouveaux allèles des gènes R qui vont reconnaître les nouveaux effecteurs du pathogène pour reprendre la réponse immunitaire ETI. On peut donc observer une co-évolution des gènes R de l'hôte et des effecteurs du pathogène (Jones and Dangl, 2006).

2.2.2. Défense médiée par des gènes de résistance

2.2.2.1 Les modèles de reconnaissance par les protéines des gènes R

Pour expliquer la reconnaissance des effecteurs pathogéniques médiée par les protéines des gènes R, deux théories ont été développées : la première est le **modèle « récepteur-ligand »**. Ce modèle explique que chaque molécule d'avirulence du pathogène est détectée directement et spécifiquement par une protéine réceptrice R correspondante chez le végétal. Le deuxième modèle, le **modèle de « guard hypothesis »** contredit cette explication, en affirmant que chaque protéine d'avirulence n'est pas détectée directement et spécifiquement par une protéine R correspondante. Ce sont plutôt les modifications structurales des molécules de la plante ciblée, induites par les protéines d'avirulences qui sont reconnues par les protéines R.

L'hypothèse de garde est la théorie la plus actuelle et la plus vraisemblable, la théorie de récepteur-ligand étant de plus en plus rejetée. Il est, en effet, improbable qu'il existe pour chaque protéine d'avirulence une protéine R spécifique présente dans toute la plante. Surveiller des structures clés de la plante semble être plus logique (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Chrisholm *et al.*, 2006).

Les protéines issues des gènes R peuvent être subdivisées en cinq classes :

- RLP's (receptor-like proteins) : ces protéines peuvent servir de récepteurs extra- ou intracellulaires d'expression d'éliciteurs des gènes avr correspondants. Ils sont construits de répétitions riches en leucines (LRR) extracellulaires et d'un domaine cytoplasmique.
- RLK's (receptor-like kinases) : elles peuvent transmettre un signal vers d'autres kinases pour l'amplification. Elles consistent en des LRR extracellulaires et un domaine Sérine-thréonine protéin kinase
- TIR-NB-LRR : ces protéines contiennent un domaine TIR homologue du domaine Toll/Interleukine 1 intracellulaire des cellules animales
- CC-NB-LRR : protéines contenant des N-terminales coiled-coil
- Codent pour Serine-threonine protéine kinase qui intervient dans la transduction des signaux du système de défense

Il n'y a pas de relation entre la catégorie de gène de résistance et le type d'organisme contre lesquels elles agissent (Chrisholm *et al.*, 2006).

La défense médiée par les gènes de résistance est induite deux ou trois heures après l'interaction plante-pathogène. Elle s'observe au niveau des cellules touchées, mais peut également être détectée au niveau des cellules environnantes.

Les réactions de défense aboutissent à une réponse hypersensible (HR) ponctuelle puis à une Résistance Systémique Acquise (SAR) de la plante entière. Elles déclenchent entre autres l'activation des gènes de résistance et d'autres réactions moins caractéristiques, mais aussi importantes, comme la production de ROS (Reactive Oxygen Species), la production d'oxyde nitrique, l'augmentation du flux transmembranaire d'ions et le renforcement de la paroi cellulaire (callose, lignine) contre la dégradation de cette dernière par les pathogènes. Entre autre on peut détecter l'activation transitoire de kinases, la production de protéines anti-microbiennes (défensines) et de métabolites anti-microbiens secondaires (phytoalexines) et la synthèse de protéines de résistance (PRs) (Nurnberger *et al.*, 2004).

2.2.2.2. La réponse hypersensible

La réponse hypersensible est la réponse de défense la plus fréquente et correspond à la mort rapide des cellules localisées au niveau du site infecté par le pathogène et à la mort des cellules du pathogène. Elle limite l'infection et permet la réduction de la croissance et de la propagation du pathogène au sein de la plante entière.

Le terme « hypersensibilité » a été inventé par Stakman en 1915. L'hypersensibilité est détectée sur la plante par l'observation de cellules mortes ayant une couleur brune (Heath, 2000). La réponse hypersensible est une réaction complexe qui s'active très tôt après l'attaque des pathogènes, elle est normalement contrôlée par des interactions directes ou indirectes entre les produits des gènes d'avirulence des pathogènes et ceux des gènes de résistance de la plante (Lam *et al.*, 2001).

Les cellules adjacentes aux premières cellules mortes présentent parfois des caractéristiques de mort cellulaire par apoptose comme la condensation de la chromatine et le clivage endonucléolytique, la libération du cytochrome C et le basculement des phospholipides membranaires. C'est pourquoi la réponse hypersensible a été conceptuellement et mécanistiquement, associée à la mort cellulaire par apoptose. Cependant, les réseaux moléculaires de ce type de mort cellulaire programmée n'étant pas encore totalement élucidés, il est difficile de conclure si ce phénomène ressemble à l'apoptose, à la nécrose ou encore à l'autophagie, des processus présents chez les cellules animales. En effet, l'apoptose animale et la mort cellulaire programmée de type hypersensible chez les plantes ne sont pas rigoureusement identiques, même si elles sont toutes les deux des mécanismes génétiquement programmés (Mur *et al.*, 2008). Toutefois, certaines caractéristiques de l'apoptose animale, dont la formation de corps apoptotiques, ne sont pas observées lors d'une réaction d'hypersensibilité.

Malgré quelques différences, un certain degré de conservation dans le processus de mort cellulaire programmée existe chez tous les eucaryotes. Actuellement, Mur *et al.* (2008) propose toutefois de considérer la réponse hypersensible plutôt comme une réponse « nouvelle » et non associée à l'apoptose.

La mort cellulaire est une partie importante de la vie, elle est essentielle pour la croissance et le développement des eucaryotes. Comme elle est primordiale pour maintenir en équilibre la prolifération, la croissance, l'élimination des dommages et la différenciation chez les cellules animales où elle est bien définie, les mécanismes de son équivalent végétal sont recherchés depuis longtemps (Hofius *et al.*, 2007).

Le pathogène est détecté par les produits des gènes de résistance qui vont induire un changement du potentiel membranaire et de la perméabilité du plasmalemmes aux ions. Ces modifications entraînent une augmentation du pH extracellulaire. Cette alcalinisation résulte d'une augmentation de l'efflux de K^+ et d'une augmentation de l'influx de Ca^{2+} et de H^+ . Ces flux d'ions renforcés déclenchent la réponse hypersensible, qui va aboutir à la mort cellulaire et la formation de lésions locales. En parallèle, des cellules qui subissent la réponse hypersensible produisent des espèces d'oxygène réactionnelles (ROS), ce qu'on appelle « oxydative burst ». Aucun des signaux chimiques mentionnés dans ce paragraphe ne peut, à lui seul, causer la réponse hypersensible, mais l'interaction entre les différents signaux causant la réponse hypersensible n'est pas encore bien connue (Zimmermann S. *et al.*, 1999)

2.2.2.2.1 Mécanismes étudiés lors de cette étude

2.2.2.2.1.1. Réponses membranaires

- **Alcalinisation du milieu extracellulaire**

Une caractéristique bien connue de la réponse hypersensible est l'alcalinisation du milieu extracellulaire de la cellule, mesurable dans le milieu de culture (Felix and Boller 1995). Cette alcalinisation du milieu extracellulaire se fait par inhibition de l'ATPase pompe à protons de la membrane plasmique (PMA) par une voie de signalisation dépendant de la concentration en ions calcium et de protéines kinases, elles aussi, calcium dépendantes (Atkinson and Baker, 1989).

Cette inhibition est accompagnée d'une activation des antiports K^+/H^+ et du cotransporteur H^+ /soluté (Schaller et Oecking, 1999).

Normalement, la PMA est la pompe électrogénique la plus importante des plantes. Elle génère le gradient protonique de -150mV à travers de la membrane plasmique et elle maintient un pH neutre dans le cytoplasme, et un pH acide (pH 5) dans l'apoplasme (Luo *et al.*, 1999).

L'inhibition de la pompe PMA constitue un passage d'un métabolisme normal à un métabolisme de défense : elle permet de conserver de l'énergie (ATP) pour les différentes voies de défense (Frick et Schaller, 2002). La concentration en H^+ monte ainsi à l'intérieur de la cellule jusqu'à ce que le potentiel membranaire tende vers zéro.

- **Concentration potassique**

La polarisation membranaire est une différence entre le potentiel électrique intérieur et le potentiel électrique extérieur de la cellule. Le potentiel électrique interne va tendre vers zéro, vu l'inhibition des pompes à proton. Les H^+ n'étant plus excrétés, il n'y a plus séparation de charges et donc plus de potentiel membranaire. L'entrée de K^+ se fait par l'intermédiaire des canaux de potassium. Une fois que le potentiel électrique au sein de la cellule tend vers zéro, le potassium ne sera plus entré par diffusion passive. Une fois que le K^+ ne pourra plus entrer dans la cellule, sa concentration va augmenter dans le milieu extérieur (Atkinson *et al.*, 1985). En plus, pour contrecarrer cette perte de potentiel membranaire, causée par l'augmentation de la concentration des ions H^+ à l'intérieur de la cellule, les ions K^+ sont expulsés de la cellule par des « potassium outward rectifier channels » (Thomine S., *et al* 1994).

- **Concentration en peroxyde d'hydrogène**

Les espèces réactionnelles de l'oxygène (ROS) sont générées comme produits secondaires par la plupart des processus générant de l'énergie. En situation normale, ils sont produits en particulier par les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes avec beaucoup d'autres oxydases. Grâce à une machinerie antioxydante, la production et la destruction des ROS se trouve normalement en équilibre. Tout stress biotique ou abiotique déséquilibre cette balance, la machinerie antioxydante de la cellule ne suffit plus et les ROS commencent à s'accumuler. Quand les ROS commencent à s'accumuler, ils finissent par générer un choc respiratoire, plus couramment appelé "burst oxydatif" (Van Breusegem F. et Dat J.F., 2006).

Le choc respiratoire se caractérise par une exaltation de la consommation en O_2 et une importante production de formes actives de l'oxygène. Deux enzymes intervenant directement dans la production du H_2O_2 sont la peroxydase pariétale et une NAD(P)H-oxydase. Les deux enzymes consommant du NADH sont activées, soit directement par un éliciteur, soit indirectement par une chaîne de transduction du signal localisée dans la membrane plasmique (Lepoivre P., 2003).

Cette réaction peut être mesurée par augmentation de la concentration en H_2O_2 extracellulaire. Des concentrations de H_2O_2 élevées peuvent avoir plusieurs effets simultanés : un effet antimicrobien, une activation des gènes de défense, un renforcement de la paroi cellulaire, un renforcement de la réponse hypersensible et la biosynthèse d'acide salicylique (Low et Merida, 1996)

Activity	Species and tissue	Reference
YVADase (VPE)	Tobacco leaf tissue	del Pozo and Lam, 1998
	Barley embryonic suspension cells	Korthout <i>et al.</i> , 2000
	Tobacco BY2 cells	Mlejnek and Procházka, 2002
	White spruce, germination of seeds	He and Kermode, 2003
	<i>Pisum sativum</i> seedlings	Belenghi <i>et al.</i> , 2004
DEVADase	<i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings	Danon <i>et al.</i> , 2004
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , fumonisin B-induced, leaf lesion	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005
	Barley embryonic suspension cells	Korthout <i>et al.</i> , 2000
	Tobacco (BY2) suspension cells	Tian <i>et al.</i> , 2000
	Tobacco BY2 cells	Mlejnek and Procházka, 2002
	White spruce, germination of seeds	He and Kermode, 2003
	<i>Pisum sativum</i> seedlings	Belenghi <i>et al.</i> , 2004
	Norway spruce, embryogenic cell line	Bozhkov <i>et al.</i> , 2004; Suarez <i>et al.</i> , 2004
	<i>Avena sativa</i> leaves	Coffeen and Wolpert, 2004
	<i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings	Danon <i>et al.</i> , 2004
IETDase (saspase)	<i>Papaver</i> pollen	Thomas and Franklin-Tong, 2004
	<i>Avena sativa</i> leaves	Coffeen and Wolpert, 2004
	<i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings	VI Rotari and F Gallois, unpublished data
LEHDase	SI in <i>Papaver</i> pollen	Bosch and Franklin-Tong, 2007
LEVADase	Leaf of <i>Nicotiana benthamiana</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
TATDase	SI in <i>Papaver</i> pollen	Bosch and Franklin-Tong, 2007
VEIDase	Tobacco Xanthi, leaves	Chichkova <i>et al.</i> , 2004
	SI in <i>Papaver</i> pollen	Bosch and Franklin-Tong, 2007
	Barley seeds	Boren <i>et al.</i> , 2006
	Norway spruce, embryogenic cell line	Bozhkov <i>et al.</i> , 2004
VKMDase (saspase)	<i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings	VI Rotari and F Gallois, unpublished data
	<i>Avena sativa</i> leaves	Coffeen and Wolpert, 2004

Figure 7 : tableau des activités capase-like observées chez différents modèles végétaux

2.2.2.2.1.2. Signes de mort cellulaire « apoptotic-like »

- **Activités « caspase-like »**

Les «Cystéines ASpartate ProtéASES», ou bien caspases, sont les acteurs centraux du phénomène d'apoptose chez les animaux. Les caspases sont des cystéines protéases qui ont la capacité de reconnaître des séquences tétrapeptidiques et de cliver après un résidu aspartate des substrats avec une telle séquence (Donepudi and Grutter 2002). Les caspases sont des zymogènes car elles se trouvent à l'état inactif dans le cytosol de la cellule en absence de stimuli pro-apoptotiques. Les caspases prématurées sont synthétisées sous forme d'une proenzyme avec trois parties. Leur séquence primaire comprend un pro-domaine N-terminal appelé « Death domain » de 3 à 24 kDa suivi d'une large sous-unité catalytique de 20 kDa (p20) et d'une plus petite sous-unité de 10 kDa (p10). En début d'apoptose, les caspases inactives sont activées par clivages successifs de leurs sous-unités au niveau des résidus d'acides aspartiques spécifiques. Après ces clivages, les caspases ne sont pas encore totalement actives, il faut encore qu'elles s'associent sous forme de tétramères (2 petites sous-unités + 2 grandes sous-unités) pour ainsi obtenir deux sites actifs sur les deux côtés de la caspase active (Chowdhury, Tharakan and Bhat, 2008).

Comme les Caspases ont été identifiées comme activateur essentiel de mort cellulaire, des équivalents chez les plantes ont été recherchés. Les activités spécifiques caspase-like chez les plantes sont nommées par la séquence d'acides aminés qu'elles clivent. Par exemple, l'activité caspase-3 chez les animaux n'est pas appelée caspase-3-like chez les plantes, elle est plutôt appelée DEVDase.

Les activités caspase-like chez les plantes sont détectées souvent de manière indirecte, en utilisant des substrats ou inhibiteurs tétrapeptidiques synthétiques des sites de clivage connus de la famille des caspases des mammifères. Après 10 années de recherches, huit activités caspase-like ont été détectées chez les plantes. Les activités caspase-like les plus étudiées sont les DEVDases et les YVADases ; toutes les deux sont détectées dans la plupart des morts cellulaires programmées. Six autres activités caspase-like ont été détectés récemment, quand de nouveaux substrats sont devenus accessibles (Figure 7). Mais les enzymes caspase-like sont toujours un thème important de débat et de recherche.

Les séquences de plantes ressemblant le plus à celles des caspases des animaux sont celles des para- et métacaspases (Uren *et al.*, 2000). Au contraire des métacaspases, les paracaspases et les caspases semblent n'exister que chez les animaux. La seule séquence caspase-like présente chez les plantes est celle des métacaspases, celles ci peuvent être divisées en 2 classes. Il existe neuf gènes codant pour les métacaspases, chez l'*Arabidopsis thaliana*. Trois gènes codent pour la classe des métacaspases de type I (AtMCP1a-1c), celles-ci contiennent un pro-domaine N-terminal et un domaine C-terminal caspase-like. Le pro-domaine N-terminal est composé d'une région riche en prolines ainsi que d'un motif « Zinc Finger ». Cette région est suivie d'une nouvelle région riche en prolines (AtMCP1b et AtMCP1c) ou une région riche en glutamines et en prolines (AtMCP1a). Les six autres gènes codent pour la classe des métacaspases de type II (AtMCP2a-2f). Ces dernières possèdent une insertion conservée de 180 résidus des caspases activées. (Wantanabe et Lam, 2005 ; He et al, 2008 ; Bonneau et al, 2008)

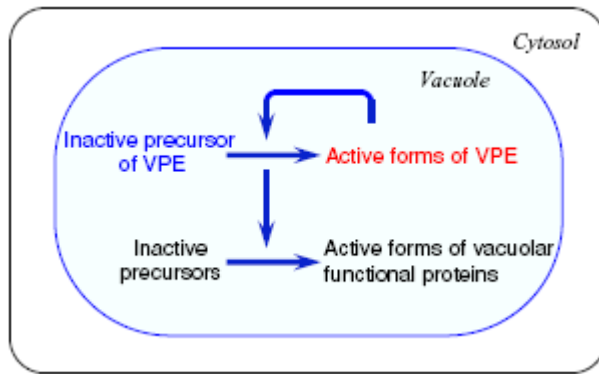


Figure 8: Activation autocatalytique des " Vacuolar Processing Enzymes "

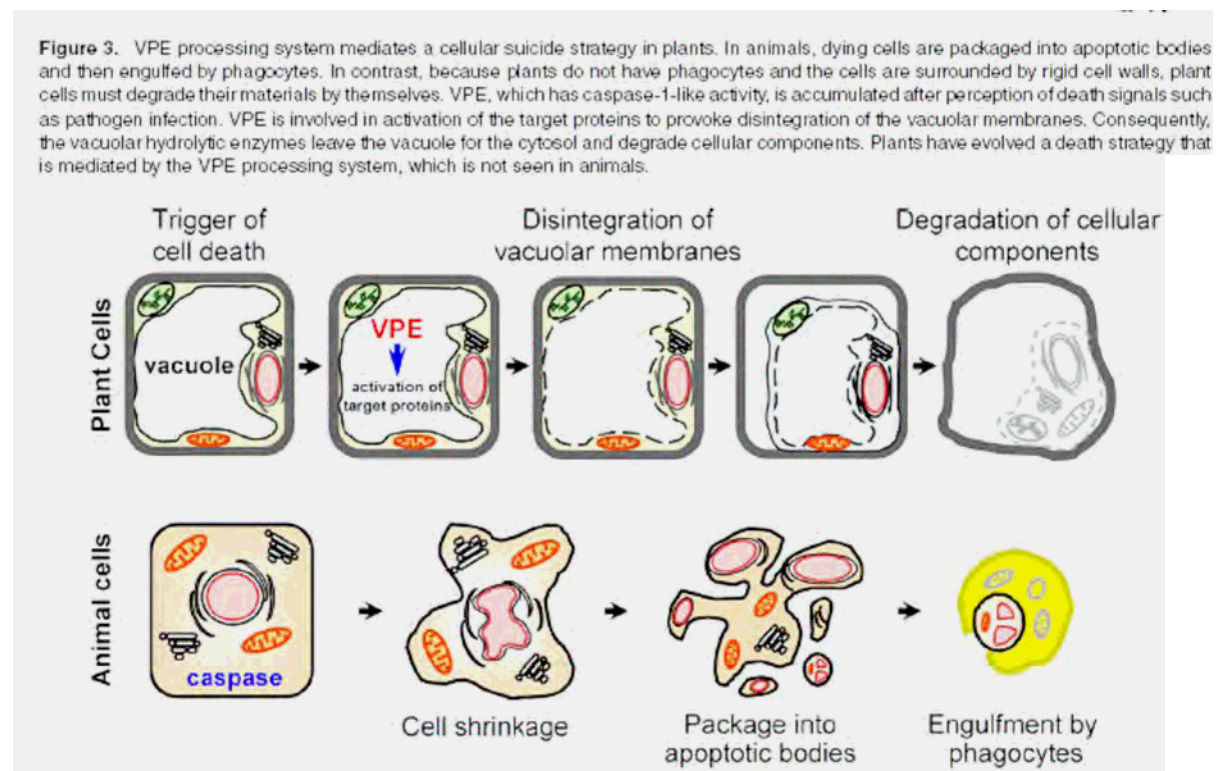


Figure 9: Comparaison entre mort cellulaire animale et mort cellulaire végétale induite par l'activité caspase(-like)

L'hypothèse selon laquelle les métacaspases ont la même fonction chez les plantes que les caspases chez les animaux, se fonde sur quatre raisons :

- L'origine commune des métacaspases et des caspases
- L'absence d'homologues caspasiques plus proches dans les plantes
- La ressemblance entre la prolifération des gènes codant pour les métacaspases et les caspases
- La fusion de la métacaspase de type 1 avec un domaine Zinc-finger aussi présent en LSD1 (Dietrich *et al.*, 1997)

Cependant, la spécificité de substrat des métacaspases, qui sont des protéases à cystéine spécifiques de l'arginine/lysine suggère, que ces dernières agissent plutôt comme des activateurs protéolytiques de protéases caspase-like que comme des exécuteurs centraux de mort cellulaire, car elles ne clivent pas de substrats caspases-spécifiques (Hofius, Tsitsigiannis *et al.*, 2007; Bonneau *et al.*, 2008)

A présent, les Vacuolar Processing Enzymes (VPE) sont les candidats les plus probables des exécuteurs de mort cellulaire chez les végétaux. Les VPEs appartiennent aux legumineuses, membres de la famille des CD (cystéines protéases), et clivent au niveau des résidus asparagines. On a pu démontrer que les VPE présentent une activité caspase-1 qui est aussi essentielle pour la maturation et le stockage des protéines des gaines que pour la réponse hypersensible induite par une attaque virale. Comme elles clivent le substrat YVAD de la caspase-1, les VEP sont aussi appelées YVADases (Hara-Nishimura, 2005).

Malgré une faible similarité de séquence, les VPE montrent des homologies de structures significatives par rapport aux caspases animales, ainsi qu'en attestent les résidus conservés dans le cœur catalytique et au niveau du site de liaison avec le substrat (Asp pocket). Les VPE possèdent une activité de clivage au niveau des asparagines et après les résidus aspartate, indiquant ainsi une spécificité de substrat homologue aux caspases. D'autre part, l'activation d'une VPE précurseur en VPE active par clivage protéolytique des pro-domaines C- et N-terminal ressemble très fort au type d'activation des caspases (Hofius, Tsitsigiannis *et al.* 2007) (Bonneau *et al.*, 2008).

La VPE est synthétisée comme précurseur protéique par le réticulum endoplasmique, puis transportée dans la vacuole où elle peut être convertie auto-catalytiquement dans sa forme active (Figure 8). Pendant l'apoptose des cellules animales, les caspases-1 sont localisées dans le cytosol et le contenu cellulaire est stocké par les phagocytes dans des corps apoptotiques. Les plantes n'ont pas de phagocytes, elles doivent dégrader elles-mêmes leurs matériaux. Les vacuoles contenant des enzymes hydrolytiques, la désintégration de la membrane vacuolaire semble activer la dégradation des structures cytoplasmiques et être un événement crucial dans la mort cellulaire (Figure 9). Comme aussi bien la localisation et l'activation de VPE lors de la mort cellulaire que l'inhibition du collapse vacuolaire lors d'un KO des quatre gènes VPE d'*Arabidopsis thaliana* (α VEP, β VEP, γ VEP et δ VEP) ont pu être démontrés, on suggère que VPE est chez les plantes un acteur central de la mort cellulaire, activée par le collapse vacuolaire (Hatsugai *et al.*, 2004 et 2006). Pour une validation de cette hypothèse, le substrat de la VEP contenant le site de clivage YVAD, intervenant dans la mort cellulaire, doit être identifié *in vivo*. (Bonneau *et al.*, 2008).

Une activité DEVDase ou caspase-3-like a pu être identifiée et localisée lors d'une réponse d'auto-incompatibilité et après irradiation par des UV aux niveaux cytoplasmique et nucléaire. La localisation nucléaire pourrait impliquer une activité DEVDase pendant la

fragmentation d'ADN comparable à celle de la caspase-3 chez les animaux (Danon *et al.*, 2004 ; Bosch and Franklin-Tong, 2007 ; Bosch *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Krzymowska et ses collaborateurs (2007) ont inhibé la réponse hypersensible du tabac à une attaque par la bactérie *Pseudomonas syringae* en appliquant un inhibiteur de la caspase-3 (Ac-DEVD-CHO). Del Pozo et Lam, 1998 avaient déjà obtenu de tels résultats, mais ils n'avaient pas pu mettre en évidence de clivage par la DEVDase. L'enzyme correspondant à l'activité DEVDase reste à ce jour encore inconnue.

• Fragmentation nucléaire

Une caractéristique clé des cellules animales en apoptose est la fragmentation systématique de l'ADN nucléaire. Chez ces cellules, la dégradation de l'ADN nucléaire est coordonnée par l'activation des endonucléases spécifiques, lesquelles sont probablement médiées par la clivage de la chromatine.

Le clivage d'ADN est organisé en deux étapes : d'abord, la fragmentation d'ADN en fragments de 300 et 50 kb. Les fragments de 50 kb sont générés par clivage entre les boucles d'ADN de +/- 50 kb. Les fragments des 300 kb sont composés de 6 boucles d'ADN (50 kb), formant une « rosette » de 300 kb. Cette fragmentation primaire précède un clivage internucléosomal de l'ADN par des endonucléases simple ou double brin. Cette fragmentation internucléosomal donne des fragments de 180-200 pb (Bortner et Oldenburg, 1995).

Dans les cellules animales, cette fragmentation d'ADN a pour but de faciliter l'emballage de l'ADN nucléaire dans des corps apoptotiques, d'inhiber la prolifération d'ADN viral et de prévenir la réponse inflammatoire ou bien auto-immune qui peuvent être causées par des fragments d'ADN libérés par des cellules mourantes (Peitsch, Mannherz et Tschopp, 1994).

Chez les plantes, plus particulièrement chez des cellules de tabac infectées par le virus de la mosaïque du tabac (TMV), on n'a pas pu observer de formation de corpuscules apoptotiques. Par contre, on a bien observé une fragmentation d'ADN. La fragmentation observée chez le tabac a été plutôt une fragmentation primaire, produisant des fragments de 50 kb et qui n'a pas été suivie d'une fragmentation internucléosomal, vu que des fragments de 180 pb n'ont pas été observés.

Parallèlement à la fragmentation induite par le TMV, une induction d'une nucléase dépendant de Ca^{2+} est détectée (Mittler R. et Lam L., 1995). L'activité majeure des nucléases dans des feuilles infectées par le pathogène a été trouvée dans l'apoplasme. Les nucléases des cellules végétales ne sont en effet activées que très tard, lors de la réponse hypersensible : elles sont activées quand l'intégrité de la membrane cellulaire est altérée. Dans une autre étude, une autre activité des nucléases a été trouvée, se déroulant plutôt pendant le processus de mort cellulaire et se situant dans le noyau (Mittler R. et Lam E, 1997).

Le clivage internucléosomal pendant une réponse hypersensible a été déjà mis en évidence en *Vigna sinensis* (Cowpea) (Ryerson et Heath, 1996) et dans des protoplastes des cellules de tomate (Wang *et al.*, 1996). Chez *Arabidopsis thaliana*, la fragmentation internucléosomale a été mise en évidence en réponse à des stress abiotiques comme la chaleur. Cette fragmentation est dépendante du temps, le « laddering » n'est observé qu'après 24h. La notion de temps dépend des plants utilisés (McCabe and Leaver, 2000).

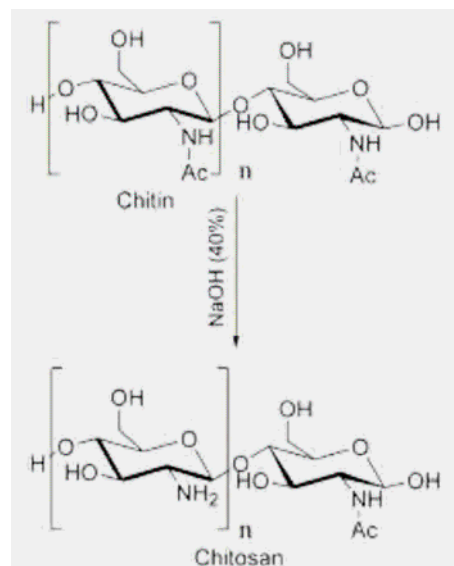


Figure 10: Désacétylation de chitine en chitosans

2.2.2.3 La résistance systémique acquise

La réponse systémique acquise (SAR) est l'activation de mécanismes de défense dans des parties non infectées de la plante ; elle se met en place à la suite de la réponse hypersensible. Elle est classée dans le groupe des réponses systémiques : les réponses systémiques peuvent être assimilées à l'établissement d'une immunité de la plante. L'infection par un pathogène va entraîner la mise en place d'une immunité contre les infections futures dans l'ensemble de la plante. Une fois activée, la SAR assure une protection de longue durée contre toute attaque ultérieure par des micro-organismes pathogènes. La réponse SAR est aussi importante pour la résistance contre les pathogènes que pour guérir d'une maladie existante. C'est une infection au niveau local entraînant la mise en place d'une réponse globale de la plante (Ryals *et al.*, 1996; Métraux *et al.*, 2002).

L'acide salicylique (SA) joue un rôle important dans la transduction du signal systémique menant à l'établissement de la SAR. La concentration en acide salicylique devient élevée dans toutes les cellules des feuilles non infectées de la plante. Le SA peut se lier à des protéines comme la catalase, ce qui va mener à la formation de radicaux phénoliques. Ces radicaux sont impliqués dans la peroxydation des lipides, lesquels peuvent alors activer l'expression des gènes de défense.

Une autre voie de signalisation est celle de l'acide jasmonique (JA). Ces deux voies paraissent antagonistes. En effet, des interactions biochimiques entre les voies de l'acide salicylique et du jasmonate empêchent l'expression optimale simultanée des deux composés (Thaler, Fidantsef *et al.* 2002).

3) Les éliciteurs

On sait que la détection de certains pathogènes est médiée par des substances chimiques sécrétées ou/ et générées par les pathogènes et par la plante elle-même. Les composants induisant une réponse de défense dans la cellule sont des PAMP, aussi appelés éliciteurs. Par définition (Rabea, Baawy *et al.*, 2003), les éliciteurs sont des substances qui peuvent induire des réponses de défense quand ils sont appliqués sur des tissus ou cellules de plantes. En dehors des PAMP, il existe de nombreux autres éliciteurs. Les éliciteurs analysés dans notre travail sont deux types d'oligosaccharides, les chitosans et les oligogalacturonides (Shibuya *et al.* 2001)

3.1 Elicitation par des chitosans

3.1.1 *Structure des chitosans*

Les chitosans sont des polymères polycationiques dérivés de la chitine. Ce sont des dérivés N-déacétylés de la chitine (polymères β -1,4- de la N-acétyl glucosamine). Les chitosans contiennent plus de 5000 unités de glucosamine et sont obtenus à partir de la chitine que contiennent les champignons, plus précisément les parois cellulaires des champignons. Ils peuvent également être obtenus industriellement à partir de la chitine contenue dans l'exosquelette de crabes ou de crevettes par déacétylation alcaline. La frontière entre chitosans

et chitine correspond à un taux de déacétylation de 50% (Rabea, Badawy *et al.*, 2003) (Figure 10).

Normalement, les chitooligosaccharides doivent avoir un degré de polymérisation supérieur à 4 pour induire une réponse biologique. Cependant, la taille et la structure optimales pour une activité élicitrice des oligosaccharides sont fonction du système expérimental utilisé. Au laboratoire, les chitosans sont généralement obtenus à partir de chitine de crustacés par désacétylation alcaline. Les fragments de polymères obtenus sont lyophilisés et ensuite fractionnés par précipitation.

Les oligochitosans sont caractérisés par leur degré de polymérisation :

- Degré de polymérisation élevé : $DP > 15$
- Degré de polymérisation moyen : $5 < DP \leq 10$
- Degré de polymérisation faible : $DP < 5$

Seuls, les chitosans de degré de polymérisation moyen sont utilisés au laboratoire.

3.1.2 Perception et reconnaissance des chitosans

La reconnaissance des oligosaccharides de la chitine est très importante pour l'induction d'une réponse basale contre un pathogène. La chitine se lie directement à une protéine récepteur-like transmembranaire LysM RLK1 (Day *et al.*, 2001). Le motif LysM semble être impliqué dans la perception de signaux liés à la chitine, venant des champignons à la surface des cellules de la plante (Kaku *et al.*, 2006). Cinq kinases récepteur-like contenant un domaine LysM ont été identifiées en *Arabidopsis thaliana*. Ces RLK sont des partenaires, associés aux membranes, de CEBiP (chitin elicitor binding protein), des plantes non-légumineuses. Le gène de LysM RLK1 a une taille de 2988 nucléotides, il a 11 introns et code pour une séquence de 1854 nucléotides. Le gène code pour une protéine de 617 acides aminés, avec un domaine extracellulaire contenant trois motifs LysM, un domaine transmembranaire et un domaine Ser/Thr kinase intracellulaire (Wan *et al.*, 2008).

On a pu démontrer qu'une autre protéine liant les chitines (CEBiP, chitin elicitor binding protein), est fortement impliquée dans la perception et la transduction des signaux de la chitine pour la défense contre des pathogènes. CEBiP est une protéine de 365 acides aminés au stade non mûré et de 328 acides aminés au stade mûré. Son poids moléculaire est de 34.640 Da (Kaku *et al.*, 2006).

Cette protéine fait partie de la membrane plasmique et semble avoir un domaine transmembranaire sur son extrémité C-terminale, mais il semble aussi qu'il lui manque un domaine intracellulaire normalement présent chez les récepteurs membranaires. Cette observation laisse à penser que CEBiP a besoin de protéines partenaires pour former un récepteur fonctionnel. L'expression des gènes de CEBiP est induite par un traitement de la plante aux éliciteurs (Kaku *et al.*, 2006). On a pu identifier deux motifs LysM dans la séquence de CEBiP, un motif qui est caractéristique des enzymes impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des bactéries (Butler *et al.*, 1991).

Elicitor	Response	Plant model	References
Chitin oligosaccharides	bind to a specific receptor	rice	(Day <i>et al.</i> , 2001), (Okada <i>et al.</i> , 2002)
	membrane depolarization		(Kuchitsu <i>et al.</i> , 1993), (Kikuyama <i>et al.</i> , 1997)
	ion fluxes		(Kuchitsu <i>et al.</i> , 1997)
	production of reactive oxygen species		(Kuchitsu <i>et al.</i> , 1995)
	phytoalexin synthesis		(Ren and West, 1992), (Yamada <i>et al.</i> , 1993)
	lignification	wheat	(Barber <i>et al.</i> , 1989)
	ion flux and protein phosphorylation	tomato	(Felix <i>et al.</i> , 1993)
	chitinase activity	melon	(Roby <i>et al.</i> , 1987)
	phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) activity	soybean	(Turakhovzhaev <i>et al.</i> , 1997)
	glucanase gene transcription	barley	(Kaku <i>et al.</i> , 1997)
Chitosan derived oligosaccharides	accumulation of phytoalexins	pea	(Hadwiger <i>et al.</i> , 1994)
		soybean	Kohle <i>et al.</i> 1984
		parsley	(Conrath <i>et al.</i> , 1989)
	synthesis of reactive oxygen species	Tomato and potato	Lee <i>et al.</i> 1999
	accumulation of defense-related proteinase inhibitors		(Walker-Simmons <i>et al.</i> , 1984), Peña-Cortes <i>et al.</i> 1988
	synthesis of callose	parsley	(Conrath <i>et al.</i> , 1989)
		tomato	Grosskopf <i>et al.</i> 1991
		Catharanthus roseus	Keen, 1975

Figure 11: Activités biologiques déclenchées par des chitoooligosaccharides dérivés de chitosans ou de chitines chez différentes plantes modèles.

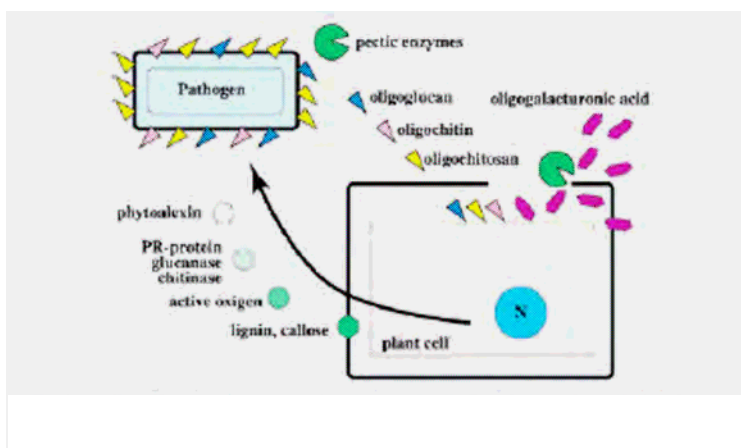


Figure 12: mécanisme de production des oligosaccharides chez les cellules végétales.

Tous les mécanismes de perception des chitosans découverts jusqu'à maintenant ne sont que des mécanismes de perception de chitosans acétylés : les mécanismes de perception des chitosans déacétylés ne sont pas encore décrits.

3.1.3 Bioactivité des chitosans

Eliciteurs de défense.

L'application des chitosans comme éliciteurs de mécanismes de défense est connue pour engendrer chez les plantes des changements physiologiques et biochimiques. Au point de vue physiologique, l'ouverture des stomates est réduite, limitant ainsi l'accès du champignon aux tissus internes de la feuille. En effet, les cellules de garde, dans les feuilles de la plante, produisent du H_2O_2 . Celui-ci est connu pour médier la fermeture des stomates induite par les chitosans. Dans la plupart des cas, l'application des chitosans induit une dépolarisation immédiate de la membrane. Cet événement peut être mesuré par une migration des ions comme l'influx de Ca^{2+} , H^+ et l'efflux de Cl^- et de K^+ (Atkinson et Baker, 1989). Cette activation des canaux se traduit au niveau cellulaire par une variation du pH (Amborabé *et al.*, 2008) (Figure 11). L'élicitation des plantes par les chitosans permet aussi de stimuler la synthèse d'acides phénoliques et de lignine, renforçant ainsi la paroi des cellules végétales (Rabea, Badawy et al. 2003). Par ailleurs, les chitosans provoquent une accumulation de lignine (Pearce and Ride, 1982), de callose (Köhle *et al.*, 1985), de phytoalexines (Köhle *et al.*, 1984) et d'inhibiteurs de protéases (Walker-Simmons *et al.*, 1984) dans divers tissus des plantes. En même temps, les chitosans induisent des protéines liées à l'acide salicylique et des protéines pathogenesis-related (PR).

Activité antivirale.

Les chitosans ont aussi une activité antivirale. Les mécanismes de cette activité antivirale sont toujours très discutés, mais le fait est avéré : les chitosans induisent des résistances contre des maladies virales, indépendamment du type viral. Le degré de polymérisation, le degré d'acétylation et la charge positive de la molécule induisent une activité antivirale variable des chitosans (Kim et Rajapakse *et al.*, 2005).

Activité antimicrobienne :

Un effet antimicrobien des chitosans a été détecté par Bautista-Baños et al. (2006), en observant par microscope des micro-organismes traités aux chitosans. Les mécanismes d'action des chitines et chitosans ne sont pas encore connus, mais on a proposé plusieurs mécanismes possibles :

- Interaction entre la charge positive des chitosans et la charge négative des membranes cellulaires des microorganismes causant la perte des protéines et d'autres constituants intracellulaires.
- Interaction des chitosans avec la membrane cellulaire causant une altération de la perméabilité cellulaire.
- L'activité chélatante des chitosans leur permet de lier spécifiquement des métaux, inhibe la production des toxines et la croissance microbienne. En même temps, ils activent dans la plante des réponses de défense (Kim et Rajapakse et al. 2005).

In vivo, les éliciteurs sont libérés par la dégradation de la paroi cellulaire fongique par des enzymes chitinases, glucanases, sécrétées par la plante infectée. De plus, les acides galacturoniques libérés des parois cellulaires de la plante attaquée par l'action des enzymes

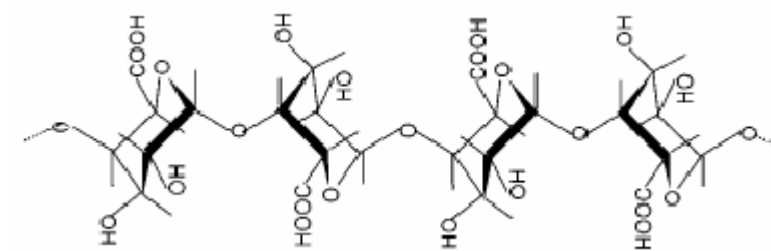


Figure 13: Structure des pectines homopolygalacturoniques en hélice de symétrie 2₁

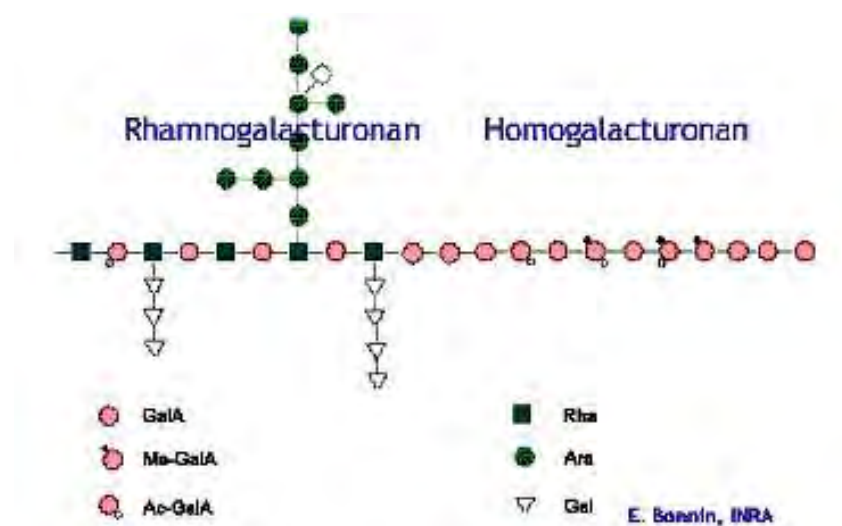


Figure 14: Structures des chaînes d'homogalacturonanes et de rhamnogalacturonanes

fongiques, ont eux-mêmes une fonction de signalisation dans l'induction de la réponse de défense de la plante (Rabea, Badawy et al. 2003) (Figure 12).

3.1.4 Perspectives d'utilisation des chitosans

Les chitosans présentent des avantages majeurs : ils sont bon marché et non toxiques. L'utilisation d'éliciteurs tels que les chitosans permettant la stimulation des défenses naturelles des plantes. Actuellement, l'utilisation d'éliciteurs en agriculture est peu courante. (Rabea, Badawy et al. 2003). Les chitosans apparaissent comme une solution et une alternative aux agents chimiques utilisés actuellement, mais critiqués pour leur impact sur l'environnement et la résistance progressive des pathogènes à ces derniers (Kim et Rajapakse et al. 2005)

Les chitosans ont d'autres applications en agriculture : ils sont utilisés comme antimicrobiens contre les champignons, les algues et les bactéries. Dans l'industrie alimentaire, ils jouent un rôle d'additif. En cosmétique, ils sont utilisés comme agent d'hydratation. .

3.2 Elicitation par des oligogalacturonides

Les oligogalacturonides (OGA) sont des dérivés des polysaccharides pectiques de la paroi cellulaire végétale. Les OGA agissent comme éliciteurs des défenses végétales. Cependant, pour induire une activité biologique comparable, d'un point de vue de la réponse aux pathogènes, à celle des chitosans, il est nécessaire d'utiliser des quantités beaucoup plus importantes d'OGA (Shibuya and Minami, 2001).

3.2.1 La pectine

La pectine (Figure 13) est un composant majeur de la paroi cellulaire primaire et de la lamelle mitoyenne des plantes. La dégradation de cette paroi primaire par des enzymes pectolytiques libère des fragments d'oligogalacturonides qui peuvent intervenir dans les voies de signalisation induisant les réponses de défense.

Les pectines appartiennent à une famille de polysaccharides très complexe, composée de différents éléments structuraux. Cette famille contient des résidus en α -1,4 d'acides D-galactosyluroniques (GalpA) dans leur chaîne principale. Les deux polysaccharides les plus abondants de la pectine sont l'homogalacturonane (HG) à ~ 65%, le rhamnogalacturonane de type 1 (RG-1) présent dans une proportion allant de 20 à 35% et rhamnogalacturonane de types 2. La teneur en rhamnogalacturonanes de type 2 (RG-2) est beaucoup plus faible (~10%) mais le rôle biologique dans l'architecture de la paroi cellulaire n'est pas à négliger (Figure 14).

L'homogalacturonane est un polysaccharide pectique homogène et linéaire, composé de ~100 résidus d'acide galacturonique liés entre eux en α -1,4. L'homogalacturonane peut être méthylestérifié sur le carboxyle en C₆, et acétylé sur l'O₂ et l'O₃. Il peut former également des liens avec d'autres esters de structures inconnues.

Les rhamnogalacturonanes 2 sont un constituant très complexe de la pectine, conservé chez toutes les plantes. Les rhamnogalacturonanes 2 sont constitués d'une chaîne principale d'un

minimum de huit résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4. Sur la chaîne principale, plus précisément sur les résidus d'acide galacturonique, différents types de sucres sont liés.

Le rhamnogalacturonan 1 a une chaîne principale formée de « n » répétitions d'un disaccharide de [-1,4 α -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1-4-]n. Des chaînes branchées ou linéaires de α -L-Araf et β -D-Galp sont fixées sur 20-80% des résidus de la chaîne principale. La diversité structurale élevée observée chez les RG-1 conduit à penser qu'ils peuvent être impliqués dans un grand nombre de fonctions différentes de la cellule (Ridley *et al.*, 2001 ; Mohnen, 2008).

La pectine est présente dans la paroi cellulaire et forme un complexe avec des ions calcium. La fixation des ions calcium par les pectines assure la cohésion des différentes couches de la paroi cellulaire (Cabrera *et al.*, 2008).

3.2.2 Les oligogalacturonides (OGA)

Les OGA proviennent d'une fragmentation des homogalacturonanes de la paroi primaire végétale. Ces fragments sont composés de deux à vingt résidus α -1,4-D-galactopyranosyluroniques linéaires (Hahn et al., 1981). Ils sont libérés sous forme de fragments produits par des endopolygalacturonases (EPGases) et par des endopectate lysases (ePLases) qui sont sécrétées, par exemple, par un pathogène dégradant la paroi cellulaire végétale. Les OGA libérés sont utilisés comme source de carbone pour le pathogène, mais constituent également un signal d'initiation des réponses de défense de la plante. Les réponses biologiques par traitement utilisant des OGA sont fonctions de la plante, du bioessai et de la structure chimique de l'OGA utilisé (Coté *et al.*, 1998, Coté et Hahn., 1994). Dans cette introduction, nous présenterons les réponses de défense induites par un traitement aux OGA.

3.2.3 Les réponses de défense induites par les oligogalacturonides (OGA)

Les réponses biologiques les plus importantes sont détectées par les traitements sur plantes ou sur cellules végétales avec des OGA d'un degré de polymérisation (DP) de 10 à 16. Le degré de polymérisation le plus actif se situe aux alentours de 12 (Coté et Hahn, 1994).

Les OGA sont actifs à des concentrations très différentes, suggérant que la reconnaissance des OGA est fonction de nombreux récepteurs présentant des affinités différentes (Coté et Hahn, 1994). La mise en contact d'OGA avec une suspension cellulaire de tabac entraîne la fixation de ces derniers à la paroi cellulaire de manière ionique. On suppose qu'avant que la plante puisse percevoir les OGA, tous ces sites pariétaux doivent être préalablement occupés (Mathieu et al., 1998).

Les homogalacturonanes forment des structures appelées « egg-box », qui s'auto-assemblent en fonction de la concentration en Ca^{2+} . La fixation des ions Ca^{2+} entre les deux chaînes homogalacturonanes se fait par des interactions électrostatiques (Liners et al., 1989, 1992). Les caractéristiques structurales et ioniques induisant une bioactivité des OGA sont semblables à celles nécessaires à la formation de structures en egg-box. On suppose que cette conformation spécifique est reconnue par un système de perception de la plante (Coté et Hahn, 1994 ; Messiaen et Van Cutsem 1994 ; Messiaen et Van Cutsem, 1999).

Activity	DP range	Plant	References
Plant defense responses			
Induction of phytoalexins	8-13 3-12 9-15 ≥3 9-15 Ca 20	soybean soybean castor bean parsley bean pea	(Hahn <i>et al.</i> , 1981) (Komae <i>et al.</i> , 1990) (Jin and West, 1984) (Davis and Hahlbrock, 1987) (Tepper and Anderson, 1990) (Walker-Simmons <i>et al.</i> , 1984)
Induction of shikonin	12-15	listhospermum	(Tani <i>et al.</i> , 1992)
Induction of PAL	>9 9-15	carrot bean	(Messiaen <i>et al.</i> , 1993) (Tepper and Anderson, 1990)
Induction of chalcone synthase	9-15	bean	(Tepper and Anderson, 1990)
Induction of β-1,3-glucanase	≥3	parsley	(Davis and Hahlbrock, 1987)
Induction of chitinase	ND	tobacco	(Broekaert and Peumans, 1988)
Induction of lignin	8-11 8-15 9-15	cucumber castor bean bean	(Robertsen <i>et al.</i> , 1990) (Bruce and West, 1989) (Tepper and Anderson, 1990)
Induction of proteinase inhibitors	2-6 Up to 20 2-3 1-7 & 10-20	tomato	(Farmer <i>et al.</i> , 1991) (Moloshok and Ryan, 1989) (Thain <i>et al.</i> , 1990)
Induction of isoperoxidases	ND	castor bean	(Bruce and West, 1989)
Inhibition of hypersensitive response	ND	tobacco	(Baker <i>et al.</i> , 1990)
Elicitation of necrosis	ND	cowpea	(Cervone <i>et al.</i> , 1987)
Activation of defense-related genes	>9	carrot	(Messiaen and Van Cutsem, 1993)
Suppress disease resistance	Low dp	wheat	(Moerschbacher <i>et al.</i> , 1999)
Induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis	Low dp	<i>arabidopsis</i>	(Norman <i>et al.</i> , 1999)
Development and growth			
Flower formation	10-14	tobacco	(Eberhard <i>et al.</i> , 1989)
Root formation	12-14	tobacco	(Bellincampi <i>et al.</i> , 1993)
Cell wall thickening and cell divisions	12-14	tobacco	(Altamura <i>et al.</i> , 1998)
Changes in the developmental pattern	9-18	carrot	(Baldan <i>et al.</i> , 2003)
Inhibit auxin-regulated protein	9-18	bean	(Bellincampi <i>et al.</i> , 1995)
Inhibition of auxin-induced elongation	>8	pea stem	(Branca <i>et al.</i> , 1988)
Induction of ethylene	>8 & 5-19 5-19 <8	tomato pear zucchini	(Campbell and Labavitch, 1991a,b) (Balandran-Quintana <i>et al.</i> , 2002)
Reduce stomatal opening	ND	tomato	(Lee <i>et al.</i> , 1999)

Figure 15: Réponses de défense et de morphogenèse initiées par la perception d'OGA chez différents modèles végétaux

La formation d'une structure egg-box commence par la liaison d'un ion de calcium par deux chaînes d'homogalacturonanes. La liaison de ce premier ion favorise l'alignement des deux chaînes l'une par rapport à l'autre, qui à son tour facilite la liaison d'autres ions calcium par un processus coopératif. Au cours du temps, deux chaînes partiellement associées peuvent se dissocier et se réassocier sur des longueurs progressivement plus grandes, jusqu'à ce que les deux chaînes d'homogalacturonanes soient alignées et liées sur leur totalité. On parle de la maturation des « egg box » (Cabrera et al., 2008). Les structures en dimères d'egg-box (deux chaînes associées) peuvent se lier entre elles pour former des multimères d'egg-box. Les chaînes sont maintenues ensemble par des forces électrostatiques, des forces de van der Waals et des ponts d'hydrogènes (Braccini et Perez, 2001).

Le mécanisme de la transduction du signal pectique est toujours inconnu. Cependant, on a détecté après un traitement avec l'éliciteur OGA : une phosphorylation et déphosphorylation des protéines de la membrane plasmique, une augmentation de l'activité en calcium cytosolique, la dépolarisation de la membrane plasmique, un efflux de Cl^- et K^+ , un influx de H^+ , l'alcalinisation du milieu extracellulaire, l'acidification du cytoplasme, l'activation des MAPK, l'activation de la NADPH oxydase et la production des espèces réactives d'oxygène, l'expression précoce et tardive des gènes pour la défense, la production d'éthylène et de jasmonate et l'accumulation de métabolites secondaires (Messiaen J., 1994).

Les réponses de défense initiées par la perception des OGA sont très nombreuses et dépendent fortement du degré de polymérisation des fragments pectiques et du modèle d'étude (Figure 15).

3.3 Interaction entre chitosans et pectine

En solution, les chitosans polycationiques et les pectines polyanioniques peuvent interagir en formant des complexes polyélectrolytiques (Chou et al., 2006). Les interactions entre des chitooligosaccharides et des structures « egg-box » des oligogalacturonides dépendent de la taille des OGA, de la proportion des deux éliciteurs, de la taille (DP) et de la charge (DA) des COS.

Le modèle d'association en egg box modélisé par Braccini et Perez en 2001 présente une association coopérative à l'aide d'ions de calcium de deux chaînes d'oligopectates qui forment un angle entre elles. Des chitooligosaccharides partiellement acétylés peuvent se lier aux faces externes de ces structures « egg-box » pour les stabiliser (Cabrera et al., unpublished). Les chitooligosaccharides partiellement acétylés ne sont pas capables de remplacer les ions de calcium à l'intérieur des egg-box. Les chitooligosaccharides complètement déacétylés ont un effet de destruction complète des egg-boxes, aux mêmes concentrations utilisées précédemment. Au contraire des chitooligosaccharides avec un degré d'acétylation de 50% qui ne montraient aucune interaction avec les egg-box.

A concentrations croissantes par rapport aux oligogalacturonides, les chitooligosaccharides partiellement acétylés commencent à détruire les structures en egg-box. On peut observer l'effet toxique de ces COS sur la viabilité cellulaire, mais à des concentrations cellulaires supérieures à celles utilisées avec des chitooligosaccharides complètement déacétylés. Les concentrations en COS nécessaires pour détruire la conformation en egg-box des pectines augmentent avec le degré d'acétylation des chitooligosaccharides (Cabrera et al., 2008, résultats non publiés).

4) Modèle cellulaire d'étude

Les premières études sur *A. thaliana* ont débuté en 1873 par la découverte du premier mutant par Alexander Braun. Ce mutant a été trouvé dans un champ proche de Berlin et il est connu sous le nom de « *Agamous* ». Ce nom est dû à la mutation dans ce gène, codant pour un des régulateurs floraux ABC. En 1907 Friedrich Laibach a publié un article sur la recherche d'une plante modèle pour la recherche en génétique, avec peu de chromosomes de grande taille. Comme *A. thaliana* a cinq paires de chromosomes mais d'une taille très petite, elle a été oubliée jusqu'en 1935. Elle réapparaît dans la littérature scientifique en 1935 : mais, à cause de sa taille, *A. thaliana* a été à nouveau jugée inappropriée. Ce n'est qu'en 1943 que Friedrich Laibach propose *A. thaliana* comme plante modèle de laboratoire. En 1945, les études de Laibach sont poursuivies par son élève, Erna Reinholz, qui étudiait la mutagenèse par rayons X. Son étude a mené à la première grande collection de mutants d'*A. thaliana* par rayons X. Avec l'aide d'Albert Kranz, Laibach et ses étudiants ont collecté plus de 750 écotypes différents à travers le monde.

A partir des années 1950-1960, par la rédaction d'articles scientifiques, John Langridge et George Rédei ont contribué à la mise en place d'*Arabidopsis* comme organisme utile pour des expériences de laboratoires biologiques. Un premier journal sur *A. thaliana* a été publié de 1964 à 1990 sous le nom de « *Arabidopsis information service* ». La première conférence internationale sur *Arabidopsis* a eu lieu en 1965, à Göttingen, en Allemagne. Dans une publication de 1975, George Rédei a proposé de prendre *A. thaliana* comme plante modèle pour l'expérimentation en génétique. En 1980, avec la révolution moléculaire et la génétique des plantes, *Arabidopsis* commence à être couramment utilisée au sein des institutions scientifiques. Elle devient la plante modèle la plus utilisée en 1986 quand son premier gène est cloné et publié. Le séquençage d'*A. thaliana* a été terminé en 2000 par l'initiative Génome Arabidopsis. Elle possède un des génomes les plus courts du monde végétal avec 157 millions de paires de bases, 5 chromosomes, 27.000 gènes et 35.000 protéines (Meyerowitz, 2001).

Il y a de nombreux avantages pour lesquels la communauté scientifique internationale a pris *A. thaliana* comme représentant des végétaux chlorophylliens vasculaires parmi les organismes modèles utilisés en génétique. Elle est utilisée comme modèle biologique au sein de nombreux laboratoires grâce à sa petite taille, sa croissance rapide et la facilité de sa culture en pot, en chambre de culture ou en serre. De plus, elle produit un grand nombre de descendants par autofécondation. L'intérêt principal pour la génétique reste la taille de son génome, le nombre de chromosomes et la facilité à y créer de nombreux mutants. Dans cette étude, nous avons utilisé les cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension permettant la prise aisée de mesures suite à des modifications du milieu.

5) Objectifs

Maladies, pathogènes et modifications de l'environnement stressent les plantes tout comme les animaux. Leurs réactions de défense chez les plantes paraissent très différentes, mais les mécanismes moléculaires sont très semblables à ce qu'on connaît chez les insectes et les mammifères. Les réseaux de signalisation moléculaire de la plante étant loin d'être totalement élucidés, on ne peut tenter qu'une approche du fonctionnement de ces systèmes de défense.

La réponse hypersensible fait partie des ces systèmes de défense. Particulièrement complexe, ses mécanismes sont très variables en fonction des plantes modèles étudiées. Le présent travail a pour but de caractériser chez *A. thaliana* certains effets de cette réponse hypersensible déclenchée suite à un traitement éliciteur qui mime une agression pathogène.

Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec une culture en suspension d'*A. thaliana* soumise à l'application d'éliciteurs oligosaccharidiques. Nous avons suivi les réponses membranaires précoces ainsi que l'activité caspase-3-like et la fragmentation internucléosomale de l'ADN qui sont des marqueurs indiscutables d'une activité « apoptotic-like ».

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point un contrôle positif de cette activité caspase 3-like dans des cellules d'*A. thaliana* en suspension traitées à la chaleur. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les réponses mentionnées ci-dessus, après élicitation des cellules avec des chitooligosaccharides, des oligogalacturonides et un mélange des deux.

1) Culture cellulaire

Les cellules utilisées durant ce travail de recherche proviennent d'une suspension d'*Arabidopsis thaliana* de souche LMM-1 ecotype *Landsberg erecta* dérivée des feuilles. Ces cellules sont maintenues en culture à 25° C sur agitateur horizontal à 115 rotations par minutes. La photopériode est de 16 heures luminosité pour 8 heures d'obscurité. Elles sont repiquées tous les 7 jours dans du milieu Murashige and Skoog basal salt with minimal organics (MSMO) (Sigma, USA) medium dans un rapport 1/10.

1.1 Repiquage de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension

- Travailler en condition stérile, sous une hotte à flux laminaire horizontale
- Dans un erlenmeyer de 250 ml diluer 5 ml des cellules d'*A. thaliana* (âgées de 7 jours) avec 45 ml de milieu MSMO
- placer les cultures cellulaires sur l'agitateur (115 rpm) dans la chambre de culture

Composition du milieu de culture MSMO (Sigma, USA) pour 1 litre :

MSMO (Sigma, USA)	4,43 g
Sucrose	30 g
NAA (1 mg/ml) (Fluca)	0,5 ml
Kinetin (1 mg/ml) (Sigma, USA)	50 µl

Mettre à pH 5,7 avec du KOH (Sigma, USA).

2) Stimulation cellulaire

2.1 Chauffage des cellules

Afin d'obtenir un contrôle positif de réponse apoptotique pour la mise au point du test caspase-like, les cellules (âgées de 5 jours) sont chauffées à 25, 40, 50 ou 65°C pendant 30 minutes (Thèse de doctorat : Gaussand G. « *Programmed cell death in plants and caspase-like activities* », 2007, Leiden University).

- incuber les échantillons pendant 30 minutes sans agitation aux différentes températures
- placer les échantillons sur agitateur (115 rpm) à 25°C pendant 20 heures

2.2 Elicitation des cellules

- Filtrer un volume de cellules d'*A. thaliana* en suspension sur miracloth et rincer 3 fois avec le même volume de milieu d'incubation MES (2(N_Morpholino)ethanesulfonic acid) (Sigma, USA)
- incuber les cellules sur l'agitateur (115 rpm) à 25° C pendant 1 heure
- prélever un échantillon et mesurer le pH
- enlever le surnageant
- remettre les cellules dans un volume de tampon d'incubation
- répéter ce rinçage 2 fois

- au dernier rinçage estimer la quantité des cellules
- enlever le surnageant
- remettre les cellules dans le volume de tampon d'incubation pour avoir une concentration finale de 0,1 g de cellules par ml de tampon de lavage
- Aliquoter en fraction 30 ml dans des erlenmeyers de 250 ml
- Laisser sédimenter les cellules et enlever le surnageant
- Ajouter les éliciteurs dilués dans le MES (Sigma, USA) et pour le contrôle 30 ml de MES (Sigma, USA)
- Incuber sur l'agitateur (115rpm) pendant 24 heures à 25°C

Composition du milieu d'incubation permettant l'éllicitation des cellules :

Sucrose	10 mM
CaCl ₂ Anhydrous (Sigma, USA)	0,5 mM
NaCl (VWR)	50 mM
MES (Sigma, USA)	0,5 mM

Mettre à pH 5,7 avec une solution de TRIS (Sigma, USA)

Concentrations d'éliciteurs utilisés dans du milieu d'incubation :

	concentration of elicitors (ppm)					
mix	50	100	200	400	700	1000
cos	50	100	200	400	700	1000
oga		100	200	400	700	

Après incubation, des échantillons sont prélevés dans chaque Erlenmeyer pour la mesure du pH, de la concentration en potassium et de peroxyde d'hydrogène.

Pour le dosage protéique et l'activité caspase-like, les cellules sont congelées et broyées dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une fine poudre.

Pour l'expérience de l'ADN laddering, une extraction d'ADN est réalisée sur cette poudre cellulaire.

3) Dosages du pH, de l'H₂O₂ et du K⁺ dans le surnageant

- Après 24 h de temps d'incubation sortir les erlenmeyers de l'agitateur
- Prélever 5 ml de cellules pour le test de viabilité
- Laisser sédimenter les cellules
- Prélever les surnageant
 - pour la mesure du pH
 - pour la mesure du H₂O₂
 - pour la mesure du K⁺
- enlever le reste du surnageant
- congeler les cellules dans l'azote liquide

3.1 Lecture du pH

La lecture du pH se fait directement après élicitation des cellules. Le pH est pris dans des échantillons du surnageants, grâce à une électrode biotrode (Hamilton) raccordée à un pH mètre (Titro Line alpha plus de Schott Instruments).

3.2 Dosage du H_2O_2

La concentration en peroxyde d'hydrogène a été mesurée par le Kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecularprobes, Oregon, USA).

- préparer
 - buffer diluer 5x : 1ml buffer + 4 ml H_2O
 - Amplex red 20 ml tenir à l'abri de la lumière
 - HRP stock 40 ml tenir à l'abri de la lumière
- solution de travail à préparer quand la plaque est prête, tenir à l'abri de la lumière :
 - 1,94 ml buffer dilué
 - 20 μ l solution amplex red
 - 40 μ l HRP stock
- courbe de calibrage de H_2O_2 :
 - 0, 2, 6, 10, 15 et 20 μ M
- plaque ELISA (Nunc, F), dans chaque puits :
 - 20 μ l d'échantillon
 - 30 μ l buffer dilué
 - blanc : 50 μ l buffer dilué
 - 50 μ l de la solution de travail a chaque puits (échantillons, blanc, courbe de calibrage)
- incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière
- lire l'absorbance à 512 nm (Bio-Tek instruments, inc ; Universal Microplate Reader ; Elx800)

3.3 Dosage du K^+

En spectroscopie d'absorption atomique, un élément sous sa forme atomique est introduit dans un faisceau lumineux. L'atome, en absorbant une partie des radiations, passe à l'état excité. Cette absorption se traduit par une diminution de l'intensité du faisceau, laquelle intensité est mesurée et directement corrélée avec la concentration de l'élément sous forme atomique.

- prélever 50 μ l de surnageant
- ajouter 1 ml HCl 1M (Sigma, USA)
- mélanger
- lire la concentration en K (mg/l) (Philips, atomic absorption spectrometer, PU9200X)

4) Mise en évidence de la mort cellulaire après stimulation

4.1 Test de viabilité 2,3,5-Triphényltétrazolium chloride (TTC)

La viabilité est testée par le TTC (Sigma, USA), qui est incolore sous sa forme oxydée. Il est réduit en formazan, coloré en rouge, par des électrons provenant de la cytochrome c oxydase.

- Prélever 5 ml de chaque échantillon
- Centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 100 g à 4°C et éliminer le surnageant
- Les cellules culottées sont incubées avec 0,6 % TTC dans un tampon KH_2PO_4 0,05 M (Merck) à pH 8,0 pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Centrifuger à 2000 g pendant 1 minute
- Le milieu d'incubation est éliminé
- Les cellules sont incubées avec 3 ml d'éthanol à 95% (Fisher scientific) pendant 15 minutes à 60° C. Pendant le temps d'incubation les cellules sont homogénéisées plusieurs fois par inversion
- Centrifuger à 4000 g pendant 1 minute
- Le surnageant est filtré sur Miracloth (Merck)
- La viabilité cellulaire est déterminée par la mesure de l'absorbance de la solution éthanol à 485 nm par un spectrophotomètre UV-visible, UV-1601PL de Shimadzu.

4.2 Dépigmentation, lyse cellulaire et extraction protéique

Comme les pigments chlorophylliens peuvent interférer avec la lecture de l'absorbance ou de la fluorescence, les échantillons sont dépigmentés avec de l'acétone 90% à 4°C

- déposer des échantillons de 0,5 g de poudre cellulaire sur glace
- ajouter 2 ml d'acétone à 90% (Fisher scientific) froid à chaque échantillon
- mélanger doucement
- centrifuger à 3000 g, 5 min, 4° C
- éliminer le surnageant
- resuspendre le culot dans 2 ml d'acétone à 90% (Fisher scientific) froid
- répéter ce lavage encore deux fois
- centrifuger : 3000 g, 5 min, 4° C
- éliminer le surnageant
- laisser le culot sur glace pendant 5 min pour que l'acétone s'évapore
- préparer le tampon de lyse :

	par échantillon (de 500 mg)
tampon lyse stock 1x	1 ml
sucrose	0,1 g
DTT 1M (Sigma, USA)	5 µl
aprotinine 4 mg/ml (Sigma, USA)	2,5 µl

- resuspendre les culots dans 1 ml de tampon de lyse
- bien mélanger
- homogénéiser les solutions pendant 30 min à 4° C sur un agitateur vertical

- centrifuger les tubes à 4000 g, 5 min, 4° C
- récupérer les surnageants
- centrifuger : 13000 rpm, 10 minutes, 4° C
- Congeler dans l'azote liquide
- Stocker à -80° C

Composition de tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique

Hepes (Sigma, USA)	10 mM
EDTA (Sigma, USA)	2 mM
CHAPS (ICN)	0,1%
DTT (Sigma, USA)	5 mM
Sucrose	10 %
Aprotinine (Sigma, USA)	10 µg/ml
Mettre à pH 7,0 avec du KOH (Merck)	

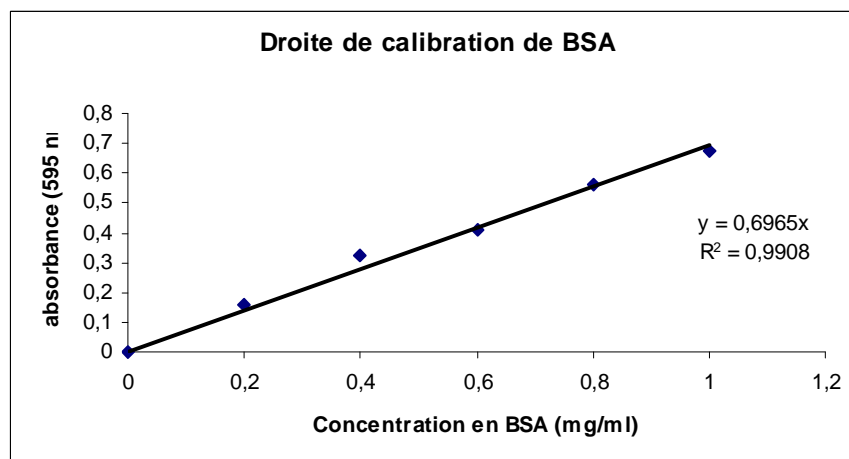
} Ajouter fraîchement

4.3 Dosage protéique par la méthode de Bradford

La concentration protéique par échantillon est mesurée par la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad).

- sortir les lysats des échantillons du congélateur à -80°C et les déposer sur la glace
- sortir les concentrations 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 2 mg/l du BSA (courbe de calibration) du congélateur à -20°C et les décongeler sur la glace
- ajouter dans chaque cuvette (Sarstedt, Germany) :
 - 1000 µl de la solution de Bradford 5x (Bio-Rad Protein Assay, Germany)
 - 10 µl ou 5 µl de l'échantillon et des différentes concentrations de BSA pour la courbe de calibration (pour le blanc utiliser de l'eau distillée) de minute en minute
- homogénéiser immédiatement
- lire l'absorbance (595 nm) en gardant l'ordre des tubes de minute en minute au spectrophotomètre (UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)

Exemple de droite de calibration permettant de déterminer la concentration des échantillons protéiques obtenus après extraction.



4.4 Dosage de l'activité caspase 3-like

4.4.1 *Dosage de la caspase-3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-pNA (Caspase 3 Colorimetric Activity Assay Kit, DEVD, Chemicon)*

- Ajouter dans les puits d'une plaque (Nunc, Apogent, Denmark)
 - Les extraits protéiques pour obtenir une quantité de 15 µg
 - tampon de réaction 5x provenant du kit
 - d'eau distillée pour porter le mélange dans chaque puits à un volume de 80 µl
 - 10 µl de substrat
- La plaque est incubée à 37° C pendant 1 heure, 1 heure 30 et 2 heures à l'obscurité
- L'absorbance est lue à 405 nm au spectrophotomètre (UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)

Composition de tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique

Hepes (Sigma, USA)	10 mM	} Ajouter fraîchement
EDTA (Sigma, USA)	2 mM	
CHAPS (ICN)	0,1%	
DTT (Sigma, USA)	5 mM	
Sucrose	10 %	
Aprotinine (Sigma, USA)	10 µg/ml	
Mettre à pH 7,0 avec du KOH (Merck)		

Composition du tampon de réaction 2x nécessaire au dosage de l'activité caspase 3-like.

PIPES(Janssen Chemica)	40 mM	} Ajouter fraîchement
NaCl (VWR)	200 mM	
EDTA (Sigma, USA)	2 mM	
CHAPS(ICN)	0,2 %	
DTT (Sigma, USA)	20 mM	
Sucrose	20 %	
Mettre à pH 7,2 avec KOH (Merck)		

4.4.2 *Dosage de la caspase-3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen)*

- Prévoir le volume nécessaire d'extrait protéique sur glace pour obtenir une quantité de 30 µg
- Ajouter pour chaque extrait protéique
 - 70 µl de tampon de réaction 2x
 - tampon de lyse pour porter le mélange à 140 µl
 - 1.4 µl de substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC (concentration finale : 13 µM) (BD Pharmingen), de minute en minute
- Les microtubes sont incubés 1 heure à 37°C à l'obscurité dans un bain-marie.
- Afin de déterminer l'activité caspase-like de chaque condition, la lecture de fluorescence se fait au spectrofluorimètre (Luminescence Spectrometer Series 2

d'Aminco-Bowman, USA) à une longueur d'onde d'excitation de 400 nm et d'émission de 505 nm. La lecture se fait aussi de minute en minute en gardant l'ordre des tubes défini lors de l'ajout de substrat.

Composition de tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique

Hepes (Sigma, USA)	10 mM	} Ajouter fraîchement
EDTA (Sigma, USA)	2 mM	
CHAPS (ICN)	0,1%	
DTT (Sigma, USA)	5 mM	
Sucrose	10 %	
Aprotinine (Sigma, USA)	10 µg/ml	
Mettre à pH 7,0 avec du KOH (Merck)		

Composition du tampon de réaction 2x nécessaire au dosage de l'activité caspase 3-like

PIPES(Janssen Chemica)	40 mM	} Ajouter fraîchement
NaCl (VWR)	200 mM	
EDTA (Sigma, USA)	2 mM	
CHAPS(ICN)	0,2 %	
DTT (Sigma, USA)	20 mM	
Sucrose	20 %	
Mettre à pH 7,2 avec KOH (Merck)		

4.5 Extraction d'ADN et migration sur gel d'agarose de « lowmelting » à 2%

4.5.1 Extraction d'ADN

L'ADN est extrait à partir de cellules en suspension selon la méthode CTAB adaptée de Murray et Thompson (1981).

- La solution de CTAB 2x est tout d'abord chauffée à 60° C et l'isopropanol mis au congélateur (-20° C).
- 750 µl de CTAB 2x sont ajoutés à 100 mg de tissus broyés et incubés à 60° C pendant 1 heure en prenant soin d'agiter les microtubes toutes les 10 minutes
- Les échantillons sont laissés à refroidir à température ambiante
- L'extraction commence en ajoutant sous hotte chimique un volume de mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (Sigma, USA) et en agitant vigoureusement pendant 10 secondes à température ambiante
- Les microtubes sont centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante
- Les phases aqueuses (phases supérieures) sont récupérées
- L'étape d'extraction est réalisée une seconde fois
- L'ADN est précipité en ajoutant 2/3 de volume d'isopropanol (VWR) absolu froid (-20° C)
- Les microtubes sont homogénéisés, laissés à incubés 1 heure à température ambiante

- Après l'incubation, les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4° C
- Les surnageants sont éliminés et 200 µl de tampon de lavage sont ajoutés aux culots
- Les échantillons sont incubés 1 heure sous agitation à 4° C
- Ces derniers sont centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante.
- Le lavage est répété une deuxième fois
- Les surnageants sont une nouvelle fois éliminés et les culots séchés pendant environ 30 minutes au SpeedVack avant d'être resuspendus dans 200 µl de Tris 10mM (Sigma, USA)
- Les échantillons sont mis sur roue à 4° C pendant 12 heures
- Afin d'éliminer tout ARN, les échantillons sont incubés 30 minutes en présence de 0.4 µl de RNase (10 mg/ml) ADNase-free à 37° C
- L'ADN est précipité en ajoutant 200 µl de Tris-HCl 10 mM (Sigma, USA), pH 8, 220 µl d'acétate d'ammonium (Sigma, USA) 7,5 M et 1.68 ml d'éthanol froid à 96% (Fisher scientific)
- Les échantillons sont homogénéisés par inversion et incubés à -70° C pendant 30 minutes
- Ensuite les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 4000 rpm
- Les surnageants sont éliminés et le culot est lavé avec 200 µl d'éthanol froid à 75% (Fisher scientific)
- Cette étape est réalisée 3 fois
- Les culots sont séchés pendant environ 30 minutes au SpeedVack avant d'être resuspendus dans 20 µl de Tris 10 mM (Sigma, USA) et stockés à -20° C
- La concentration d'ADN des échantillons peut être dosé au spectro avant de les laisser migrer sur gel

Composition de la solution CTAB 2x nécessaire à l'extraction d'ADN.

Tris-HCl (Sigma, USA)	100 mM
EDTA (Sigma, USA)	20 mM
NaCl (VWR)	1,4 M
CTAB (ICN)	2 %
PVP-40 soluble (Sigma, USA)	1 %
2-(3 mercaptoethanol) (Sigma, USA)	0,2 %
Mettre à pH 8	

Composition du tampon de lavage nécessaire à l'extraction d'ADN.

Ethanol 76% (Fisher scientific)	
Acétate d'ammonium (Sigma, USA)	10 mM

4.5.2 Migration sur gel d'agarose « low melting » 2%

- L'agarose low melting 2% est préparé et chauffé jusqu'à ce que celui-ci soit totalement soluble
- A 50 ml d'agarose low melting 2%, 3 µl de bromure d'éthidium (agent intercalant) sont ajoutés
- L'agarose est homogénéisé par plusieurs inversions et coulé sous hotte chimique dans le moule muni d'un peigne

- Le gel est laissé à polymériser sous hotte
- Pendant la polymérisation, les échantillons d'ADN sont sortis du congélateur et 4 et 10 μ l sont placés dans des microtubes en présence de 2 μ l de Bleu de charge
- Après polymérisation du gel, le peigne est retiré et le gel est placé dans la cuve de migration (Pharmacia Biotech) remplie de tampon TAE 1x (TAE 10x : Tris Acétate 400 mM, EDTA 10 mM (Sigma, USA), pH 8,0). Il faut que le gel soit bien recouvert de tampon TAE 1x.
- Les échantillons sont placés dans les puits à raison de 6 et 12 μ l par puits
- 4.5 μ l de Smart Ladder (Eurogentec, Belgium) sont placés dans un puits
- La cuve est fermée et les fils raccordés au générateur (courant = 90 mA)
- Les échantillons migrent pendant 40 minutes
- La révélation se fait sous U.V.

1) Mise au point d'un contrôle positif de l'activité caspase-like pendant la réponse hypersensible chez des cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension

Gaussand a utilisé pendant sa thèse de doctorat intitulée « *Involvement of caspases and caspase-like proteases in programmed cell death* » (2007, Leiden University), des chocs thermiques pour induire la mort cellulaire programmée de cellules de riz en suspension. Les cellules ont été traitées par un choc thermique à 50°C pendant 30 minutes, sans agitation. Vingt heures après le choc thermique initial, une augmentation significative des activités « caspases 3 et 6 like » a été mesurée. L'augmentation de ces activités caspase-like est en corrélation avec l'augmentation de la mort cellulaire ainsi que la dégradation de l'ADN par fragmentation.

A partir de ces résultats, nous avons mis au point un contrôle positif de mort cellulaire de nos cellules d'*A. thaliana* en suspension. Afin de déterminer le pourcentage de viabilité en fonction de la température du choc thermique, un gradient de température a été réalisé dans notre laboratoire par Sophie Charlier dans le cadre d'un DES. On a pu observer que la viabilité des cellules d'*A. thaliana* commençait à chuter fortement à partir de 40°C. La viabilité cellulaire est passée sous les 50% vers une température de 50°C. Ces observations sont en accord avec ce qui est observé dans les cellules de riz en suspension. Pour la mise au point du test d'hypersensibilité causée par un choc thermique, on a choisi des températures entre 40° et 65°. Les cellules de contrôles sont maintenues à 25°C.

Résultats et Discussion

1.1 Mise au point du dosage de l'activité caspase 3-like

1.1.1 Dosage de l'activité caspase 3-like grâce au substrat colorimétrique, Ac-DEVD pNA

Nous avons utilisé le kit « Caspase 3 Colorimetric Activity Assay Kit, DEVD » de Chemicon. Les cellules sont chauffées pendant 1 heure, 1 heure 30 ou 2 heures dans un bain-marie à 50°C ou 65°C. Des cellules contrôles sont maintenues à température ambiante. L'activité caspase-like DEVD est dosée par une droite de calibration (Figure 1) établie à partir d'un contrôle positive fourni par le kit. L'extraction protéique est réalisée selon les instructions du kit.

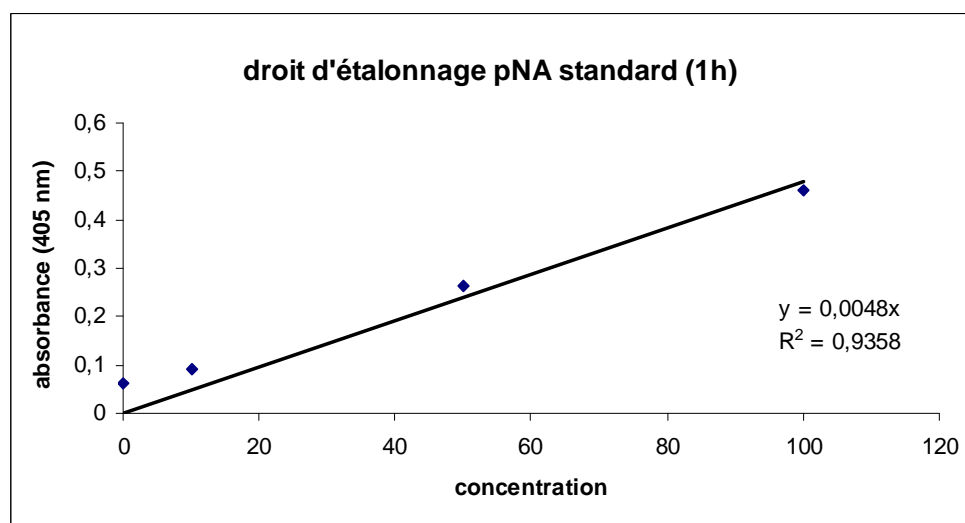


Figure 1: Droite d'étalonnage de l'activité caspase-3 like mesurée avec le substrat Ac-DEVD-pNA

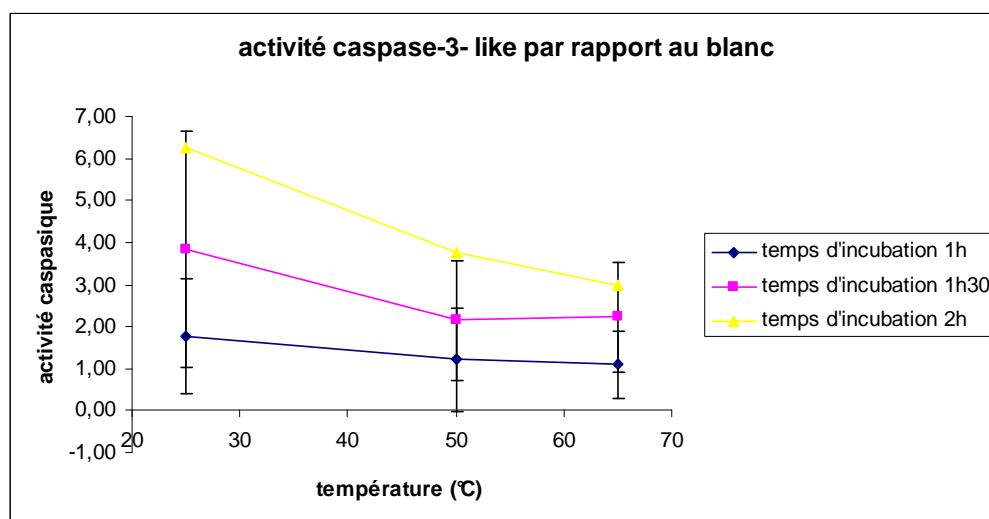


Figure 2 : Mesure de la variation de l'activité caspase-like DEVD de cellules traitées à la chaleur. Les échantillons sont prélevés dans le surnageant après 20 heures d'élitation. Les cellules contrôles n'ont pas été traitées à la chaleur. Le dosage de l'activité caspase 3-like a été réalisé grâce au substrat fluorescent Ac-DEVD-pNA.

Les résultats obtenus (Figure 2) ne nous permettent pas de dire si l'activité caspase 3 like est plus ou moins élevée en cas de choc thermique à 50°C et 65°C qu'à température ambiante vu que les écarts-types sont bien trop importants. De plus, les valeurs d'absorbance obtenues lors de la lecture sont très faibles, probablement au niveau du bruit de fond de la lecture. Le fait d'incuber plus ou moins longtemps les échantillons en présence du substrat modifie le niveau de l'activité caspase-like mesuré, mais cela ne change en rien l'écart-type des mesures. Vu que le substrat est conçu pour l'utilisation avec les cellules animales, il n'est peut-être pas compatible avec des cellules végétales.

1.1.2 Dosage de l'activité caspase 3-like avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC

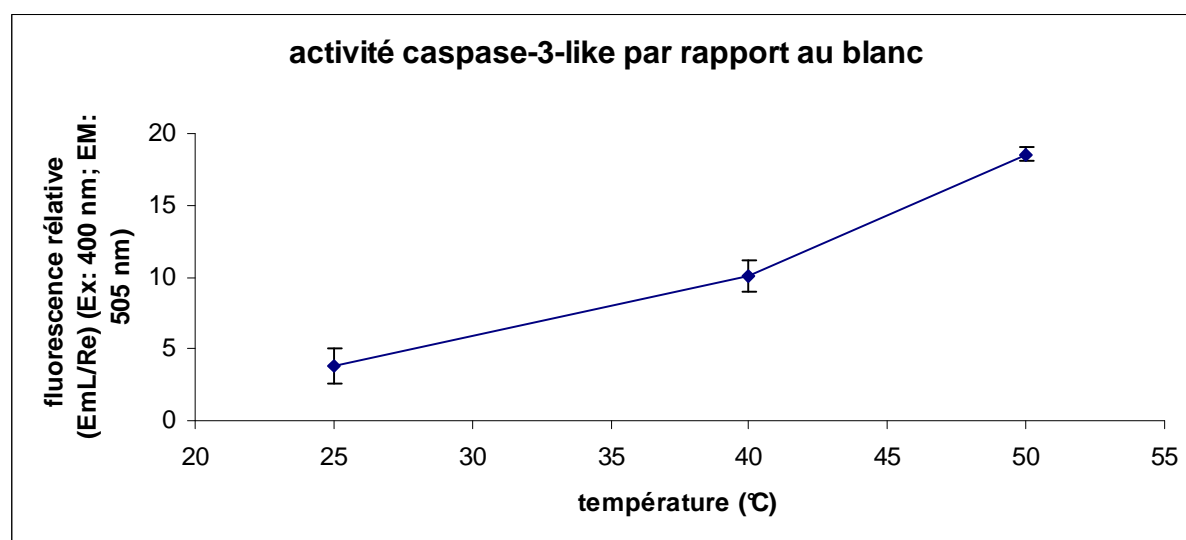


Figure 3: Mesure de la variation de l'activité caspase-like DEVD de cellules traitées à la chaleur (40°C et 50°C) pendant 30 minutes et mises à incuber à température ambiante pendant 20 heures. Les échantillons protéiques pour le dosage de caspase-like sont extraits à partir des cellules broyées. Les cellules contrôles n'ont pas été traitées à la chaleur. Le dosage de l'activité caspase 3-like a été effectué avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC.

Le dosage a été répété en changeant non seulement le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC, mais en utilisant une quantité double de protéines pendant le dosage (30 µg) (Figure 3). L'incubation des échantillons traités à la chaleur puis testés avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC donne des résultats beaucoup plus probants et plus reproductibles. Cette figure nous permet de voir que l'activité caspase 3-like est significativement plus élevée dans les cellules ayant été soumises au choc thermique (40°C et 50°C) : cette augmentation de l'activité de la DEVD caspase-like peut indiquer que le processus de mort cellulaire est déclenché dans ces cellules. Un dosage de l'activité caspase-like DEVD avec substrat Ac-DEVD-AFC nécessite une élimination des pigments des extraits protéiques sans toutefois dénaturer ces derniers. Un pic d'absorption des pigments est observable au niveau de 500 nm, longueur d'onde d'émission du substrat fluorescent utilisé. La méthode d'extraction de pigments proposée dans ce cas-ci est celle de la précipitation des protéines dans de l'acétone à 90%.

2) Caractérisation de la réponse hypersensible de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en suspension traitées avec des éliciteurs

Les moyens mis en œuvre pour mettre en évidence la réponse hypersensible sont quelques-unes des réactions déjà connues et caractéristiques pour ce type de réponse, soit chez *A. thaliana*, soit chez d'autres plantes. Les paramètres testés pendant ce mémoire sont : le pourcentage de mort cellulaire, l'alcalinisation du milieu extracellulaire, l'efflux de potassium, la production d' H_2O_2 , la teneur cellulaire en protéines, l'activation des caspases-like et la fragmentation de l'ADN.

Afin d'induire et de tester les mécanismes de la réponse hypersensible, les cellules ont été traitées aux éliciteurs pendant 24 heures. Les éliciteurs utilisés pendant cette expérience sont des chitooligosaccharides (COS) à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm, des oligogalacturonides (OGA) à des concentrations identiques et un mix des chitooligosaccharides (COS) et des oligogalacturonides (OGA) avec un rapport de 1/1 et à des concentrations finales de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm. Les chitooligosaccharides (COS) utilisés ont un degré d'acétylation de 25% et un degré de polymérisation compris entre 5 et 10, les oligogalacturonides utilisés ont un degré de polymérisation compris entre 9 et 20.

En raison de l'ampleur de la manipulation, il n'a pas été possible de comparer les trois éliciteurs au cours d'une même élicitation. Les résultats présentés en graphiques pour les comparaisons des effets des chitosans d'une part, des oligogalacturonides d'autre part par rapport au mélange (mix) d'éliciteurs viennent d'expériences différentes.

On ne peut pas rassembler les différentes élicitations en un seul graphique parce que le niveau d'expression des réponses varie de manière importante d'une élicitation à l'autre. Les graphiques choisis pour le mémoire correspondent aux meilleurs résultats obtenus lors des nombreuses répétitions réalisées.

2.1 Dosage de la viabilité cellulaire après un traitement aux éliciteurs

Une cellule peut être considérée comme vivante quand elle grandit et se développe. Les tests de viabilité sont basés soit sur les propriétés physiques d'une cellule vivante, comme leur intégrité membranaire, soit sur leur activité métabolique, comme la réduction des sels de tétrazolium. La mesure de viabilité, avec du chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC), est une mesure d'une activité réductase. Le TTC accepte des électrons issus de la chaîne de transporteurs d'électrons de la mitochondrie. La viabilité est testée par le TTC, qui est incolore sous sa forme oxydée. Il est réduit en formazan, coloré en rouge, par des électrons provenant de la cytochrome c oxydase (Loyola-Vargas et Vázquez-Flota).

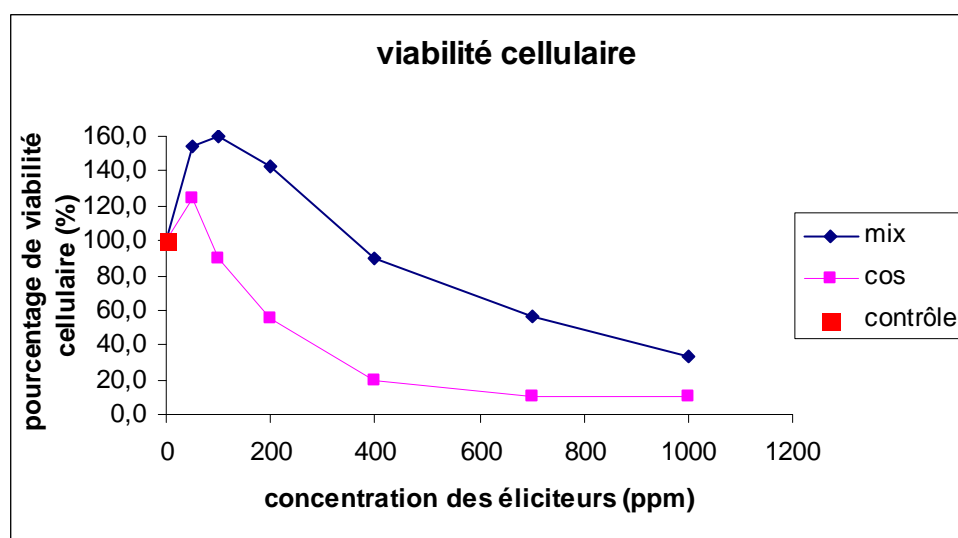


Figure 4: Effets des chitooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mélange de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm sur la viabilité cellulaire des cellules d'*A. thaliana* en suspension. La viabilité cellulaire est mesurée par le TTC sur des cellules d'*A. thaliana* de 5 jours traitées pendant 24 heures avec les éliciteurs. Le contrôle est constitué de cellules qui n'ont pas été traitées aux éliciteurs.

Les échantillons traités avec une concentration faible en chitooligosaccharides (50 ppm) montraient une viabilité de 25% supérieure au blanc. A partir des concentrations plus élevées en chitooligosaccharides, la viabilité chutait d'une manière importante. À 700 ppm, presque toutes les cellules étaient mortes (Figure 4). Ces valeurs sont en correspondance avec la perte de couleur verte des cellules vivantes que nous avons observée avec des concentrations croissantes de l'éliciteur. Les cellules traitées avec des concentrations de 700 et 1000 ppm étaient quasiment blanches.

La viabilité des échantillons traités avec le mélange de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides (1/1) était supérieure au blanc jusqu'à ce que la concentration en éliciteurs atteigne 400 ppm. La viabilité a même atteint une valeur exceptionnelle de 160% à la concentration en éliciteur de 100 ppm. À partir d'une concentration en éliciteur de 200 ppm, la viabilité a diminué continuellement jusqu'à 1000 ppm où elle n'était plus que de 35% (Figure 4). Les cellules traitées avec les concentrations de 700 et 1000 ppm étaient beaucoup plus vertes que les cellules traitées avec les concentrations correspondantes en chitooligosaccharides.

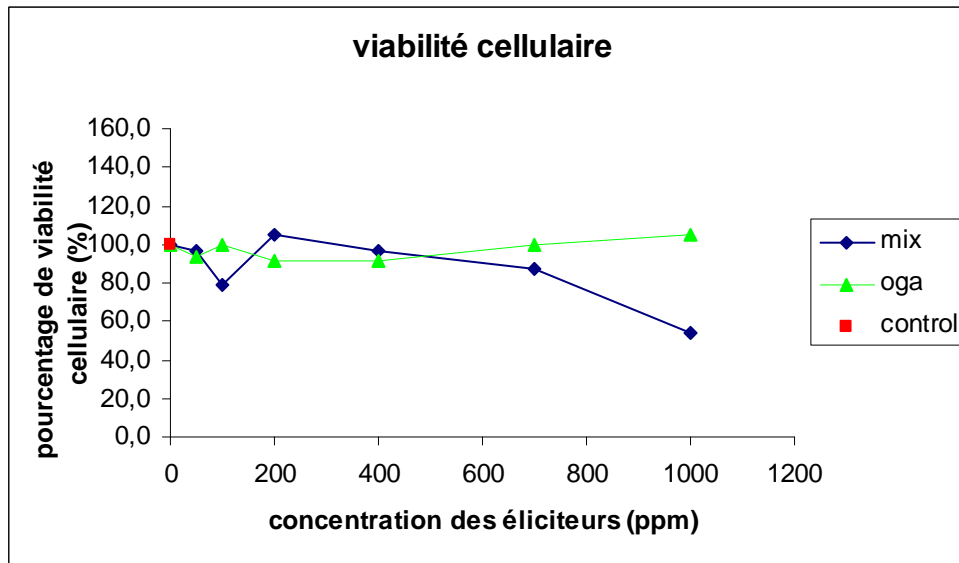


Figure 5 : Effet des oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mélange de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm sur la viabilité cellulaire des cellules d'*A. thaliana* en suspension. La viabilité cellulaire est mesurée par le TTC sur des cellules d'*A. thaliana* de 5 jours traitées pendant 24 heures avec les éliciteurs. Le contrôle est constitué de cellules qui n'ont pas été traitées aux éliciteurs.

Les oligogalacturonides seuls n'interviennent pas dans la mort cellulaire de la réponse hypersensible, mais ils ont un effet neutralisant sur la mort cellulaire quand ils sont appliqués avec les chitooligosaccharides, jusqu'à ce qu'une certaine concentration de ces derniers (Figure 5). La couleur des cellules traitées aux mixe d'éliciteurs, même à des concentrations élevées, n'avait pas changé par rapport à celle des contrôles non traités.

En conclusion, la mort cellulaire est fonction de l'éliciteur utilisé et de sa concentration. A ce stade, il n'est pas possible d'affirmer que la mort cellulaire observée suite à l'application d'éliciteurs COS fait partie de la réponse hypersensible.

2.2 Mesure du pH

L'alcalinisation du milieu extracellulaire de la cellule est une réponse connue à un traitement avec des éliciteurs oligosaccharides et une caractéristique de la réponse hypersensible (Felix and Boller 1995). Cette alcalinisation du milieu extracellulaire se fait par inhibition de l'ATPase membranaires pompe à protons (PMA) La concentration en H^+ monte à l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire s'alcalinise (Schaller et Oecking, 1999). Pendant l'expérience, nous avons mesuré la variance du pH des cellules traitées avec des chitooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm, des oligogalacturonides à des concentrations de 100, 200, 400, 700 ppm et du mélange chitooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules de contrôle.

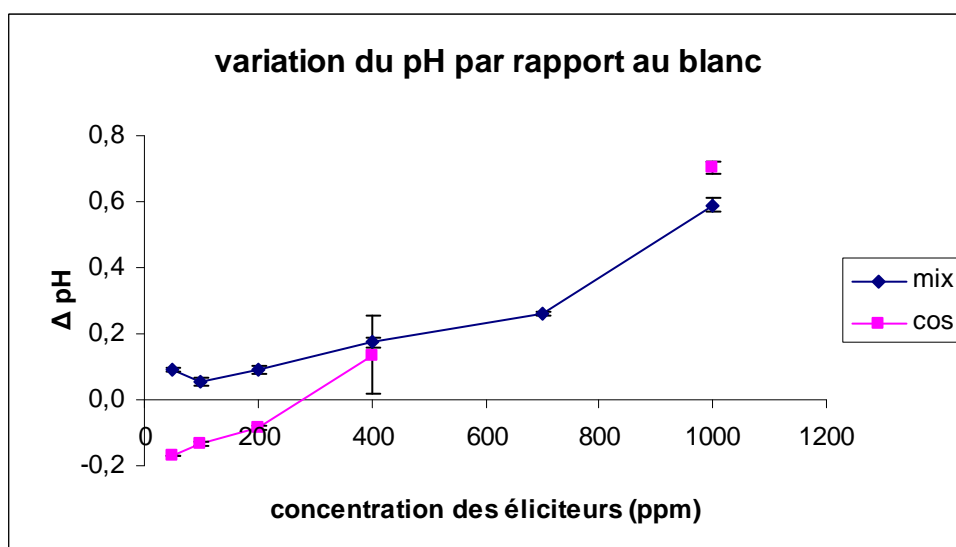


Figure 6 : Mesure de la variation de pH de cellules *d'A. thaliana* traitées avec des chitoooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mélange de chitoooligosaccharides/oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules contrôles après 24 heures d'élicitation.

Les échantillons traités avec une faible concentration en chitoooligosaccharides, (jusqu'à 200 ppm), induisaient l'acidification du milieu. A des concentrations plus élevées, le milieu de culture s'est alcalinisé jusqu'à +0,8 unité de pH par rapport aux contrôles (Figure 6).

Les cellules traitées avec de faibles concentrations de mélange en rapport (1/1) chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides ne montrent pas réellement d'acidification du milieu de culture. Le pH reste plus ou moins constant jusqu'à une concentration en éliciteur de 200 ppm. À des concentrations plus élevées, on observe une alcalinisation du milieu, que ce soit avec des chitoooligosaccharides seuls ou avec le mélange (Figure 6).

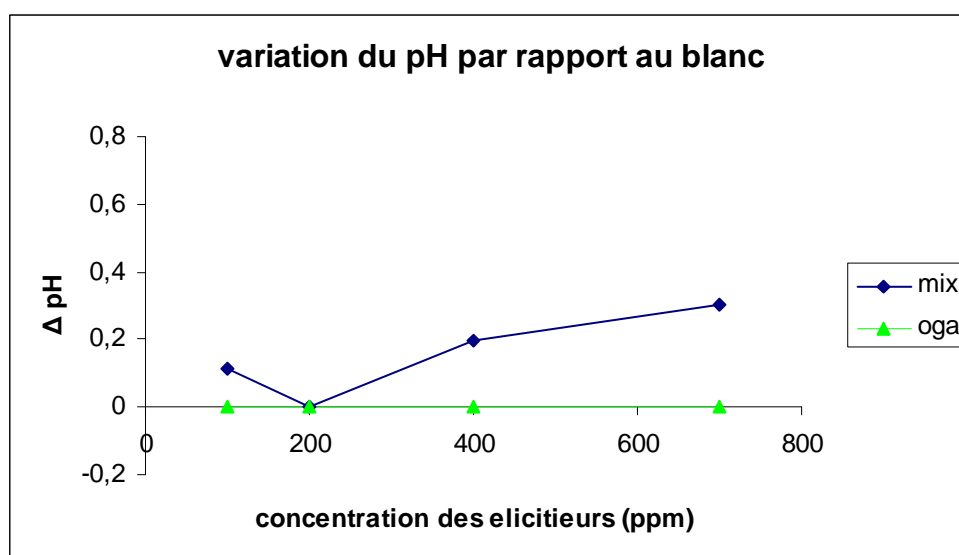


Figure 7 : Mesure de la variation de pH de cellules *d'A. thaliana* traitées avec des oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400 et 700 ppm et du mélange de chitoooligosaccharides/oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400 et 700 ppm par rapport à des cellules contrôles après 24 heures d'élicitation.

Les cellules traitées avec les oligogalacturonides seuls ne montrent de variations de pH à aucune des concentrations appliquées (Figure 7).

Les oligogalacturonides n'ont pas d'effet sur le pH du milieu de culture, contrairement aux éliciteurs contenant des chitooligosaccharides. En conclusion, la réponse de l'alcalisation du milieu extracellulaire est en fonction de l'éliciteur et de sa concentration.

2.3 Mesure de la concentration en potassium libéré par les cellules élicitées

Un flux de potassium vers le milieu extracellulaire est caractéristique d'une réponse de défense de la cellule végétale ayant perçu le signal d'attaque d'un pathogène. L'entrée de K^+ se fait par l'intermédiaire de pompes sodium/potassium. Une fois les pompes à protons inhibées, le potentiel électrique de la cellule va diminuer et tendre vers zéro, ce qui va entraîner un nouvel équilibre de distribution du K^+ de part et d'autre du plasmalemme. Les ions K^+ quittent la cellule par des « potassium outward rectifier channels ».

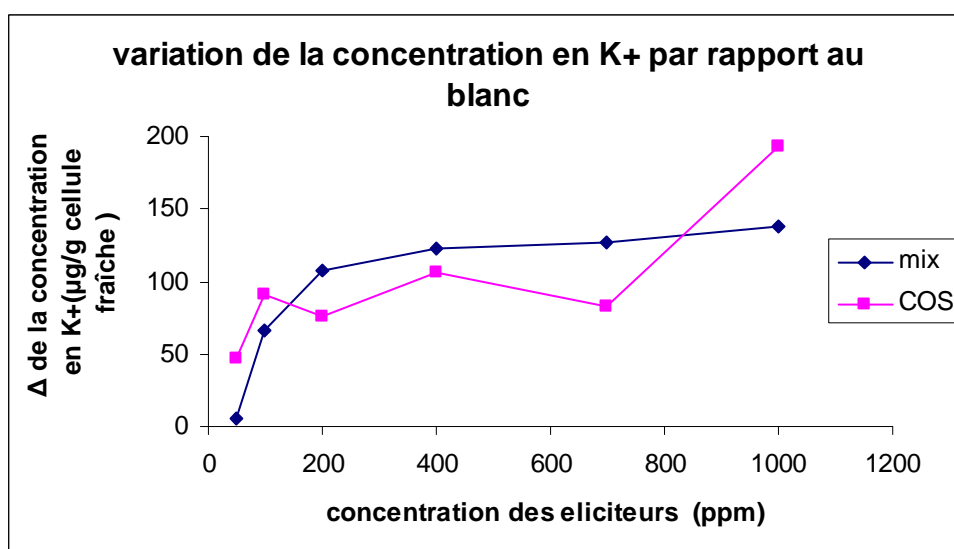


Figure 8: Variation de la concentration potassique de cellules d'*A. thaliana* traitées avec des chitooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm et du mélange des chitooligosaccharides/ oligogalacturonides avec un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules de contrôle. Les échantillons pour le test sont prélevés dans le surnageant après 24 heures d'élicitation. Les cellules de contrôle sont des cellules qui n'ont pas été traitées aux éliciteurs.

Le test nous a permis de mesurer la variation de la concentration potassique des cellules traitées avec des chitooligosaccharides, des oligogalacturonides et du mélange (1/1) des chitooligosaccharides/ oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm par rapport à des cellules de contrôle.

Les échantillons traités avec des chitooligosaccharides et les échantillons traités avec le mélange de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides (1/1) induisent une concentration en ions K^+ extracellulaire plus élevée que celle du blanc dès la première concentration en éliciteur appliquée. Les deux traitements induisent un efflux de potassium similaire dans les deux cas (Figure 8).

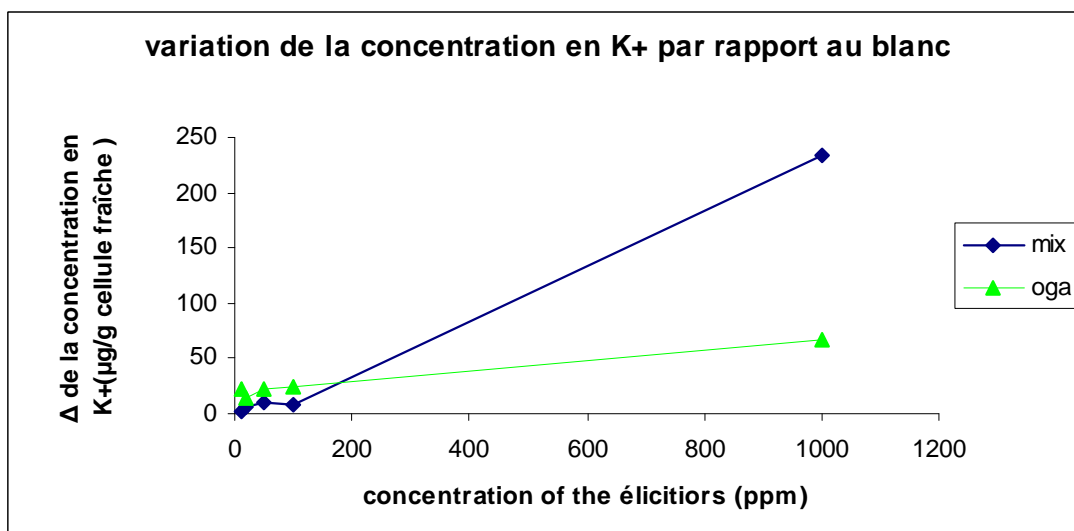


Figure 9 : mesure de la variation de la concentration potassique des cellules d'*Arabidopsis thaliana* traités avec des oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mixe des chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides avec un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules de contrôle. Les échantillons pour le test sont prélevés dans le surnageant après 24 heures d'élicitation. Les cellules de contrôle sont des cellules qui n'ont pas été traitées aux éliciteurs.

Les cellules traitées avec les oligogalacturonides seuls montrent très peu de variation de concentration en K⁺ dans le milieu de culture (Figure 9).

Les élicitation nous ont permis de mettre en évidence que la quantité de potassium libérée par les cellules élicitées par des chitosans et par le mélange est beaucoup plus importante que pour les cellules contrôles et les cellules élicitées aux oligopectates. L'élicitation des cellules avec des oligopectates seuls n'induirait pas d'effet notable sur le pH extracellulaire ni sur l'efflux de potassium, contrairement aux éliciteurs contenant des chitoooligosaccharides.

2.4 Mesure de H_2O_2

Une première étape de la réponse hypersensible est le choc respiratoire, appelé plus couramment “burst oxydative” (Apel et Hirt, 2004). Ce choc respiratoire peut être causé par des éliciteurs produits lors d’un contact hôte-pathogène, ou bien par un traitement de la plante directement par ces éliciteurs. Cette réaction peut être mesurée par le dosage de la concentration en H_2O_2 extracellulaire.

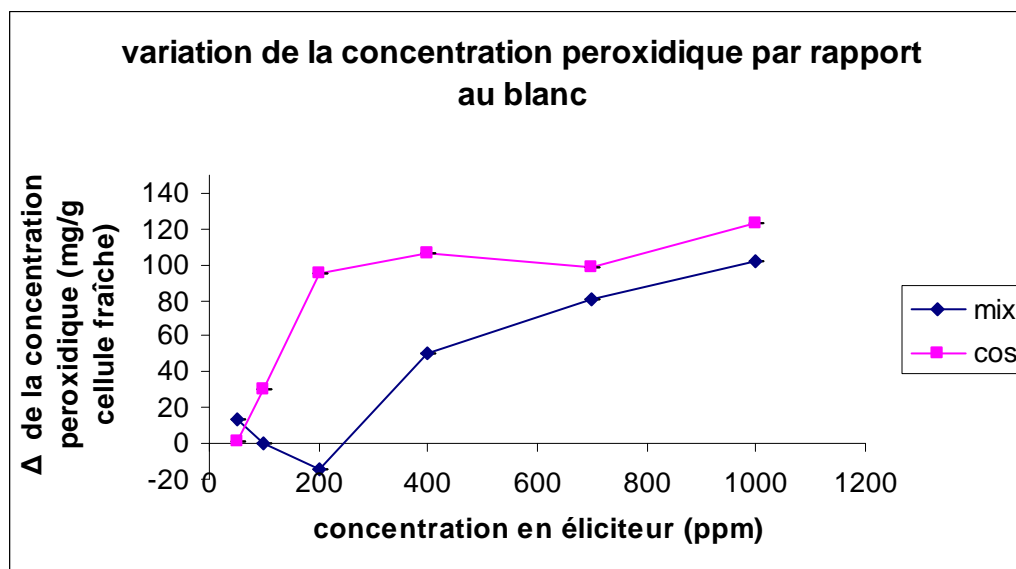


Figure 10: Variation de la concentration en peroxyde d’hydrogène des cellules d’*A. thaliana* traitées avec des chitooligosaccharides et du mélange chitooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules contrôles. Les échantillons pour le test sont prélevée dans le surnageant après 24 heures d’élicitation. Les cellules contrôles n’ont pas été traitées aux éliciteurs. La concentration est lue par fluorescence à une longueur d’onde d’excitation de 512 nm et d’émission de 630 nm.

Dans cette expérience, nous avons mesuré la variation de la concentration en peroxyde d’hydrogène des cellules traitées avec des oligogalacturonides, des oligochitosans et du mélange (1/1) de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 ppm par rapport à des cellules contrôles. La concentration en H_2O_2 extracellulaire des cellules traitées avec des chitooligosaccharides augmente fortement dès la plus faible concentration en oligochitosan pour atteindre un plateau à des concentrations plus élevées que 200 ppm (Figure 10).

La concentration en H_2O_2 extracellulaires des échantillons traités avec le mélange de chitooligosaccharides/ oligogalacturonides (1/1) jusqu’à 200 ppm ne se distingue pas vraiment du contrôle. Au-delà, la concentration extracellulaire en H_2O_2 augmente fortement sans toutefois atteindre le niveau des cellules traitées avec des chitooligosaccharides (Figure 10).

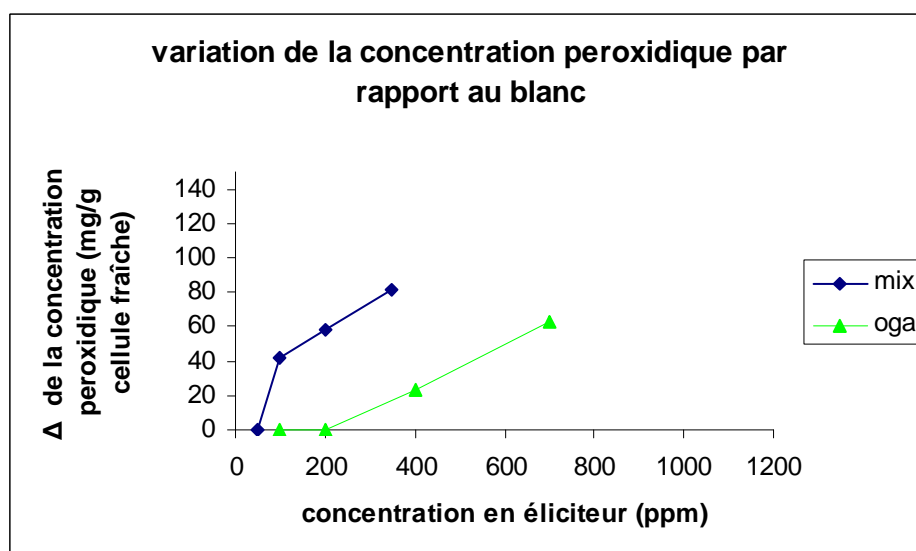


Figure 11 : mesure de la variation de la concentration du peroxyde d'hydrogène des cellules d'*Arabidopsis thaliana* traitées avec des oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 ppm et du mixe des chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides avec un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 ppm par rapport à des cellules de contrôle. Les échantillons pour le test sont prélevés dans le surnageant après 24 heures d'élicitation. Les cellules de contrôle sont des cellules qui n'ont pas été traitées aux éliciteurs. La concentration est lue par fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 512 nm et d'émission de 630 nm.

Les cellules traitées avec les oligogalacturonides seuls montrent une augmentation importante de la concentration en H_2O_2 à partir de 200 ppm. Au-delà de 200 ppm, la concentration en H_2O_2 croît continuellement avec la concentration en éliciteur (Figure 11).

Les oligogalacturonides ont un effet neutralisant sur la production d' H_2O_2 quand ils sont appliqués avec les chitoooligosaccharides ensemble. Les chitoooligosaccharides seuls agissent plus fort sur la production de H_2O_2 . La réponse de choc respiratoire est donc fonction à la fois de la nature de l'éliciteur et de sa concentration.

2.5 Dosage protéique par Bradford

Après élicitation, nous avons testé la teneur en protéines de cellules traitées avec des chitoooligosaccharides, des oligogalacturonides et du mélange chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1, à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules contrôles.

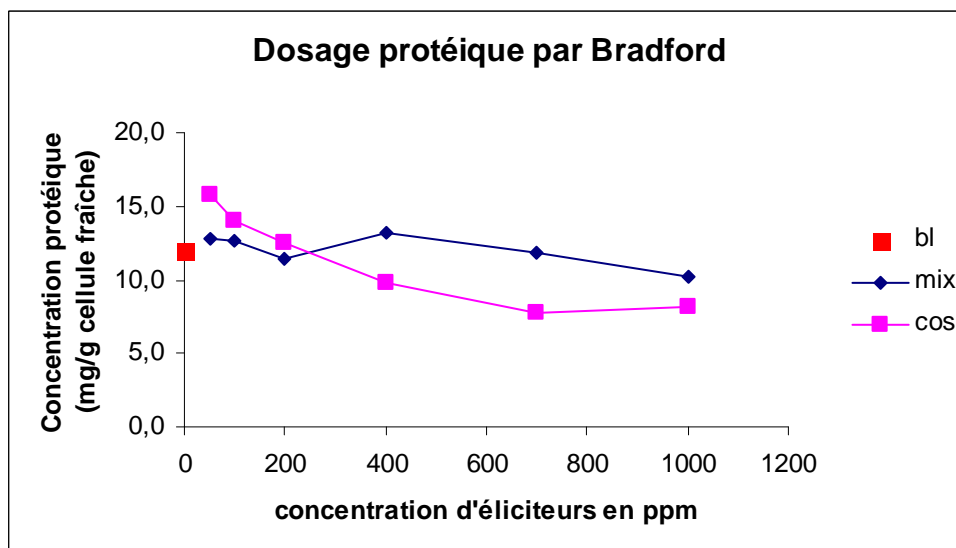


Figure 12 : mesure de la variation de la concentration en protéines de cellules d'*A. thaliana* traitées avec des chitoooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm et du mélange de chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules contrôles. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford.

La concentration en protéines des échantillons traités avec différentes concentrations de chitoooligosaccharides s'est avérée plus importante que celle des cellules contrôles jusqu'à une concentration de 200 ppm. La concentration protéique des cellules chute continuellement à partir de la plus faible concentration de 50 ppm et se stabilise vers 700 ppm (Figure 12).

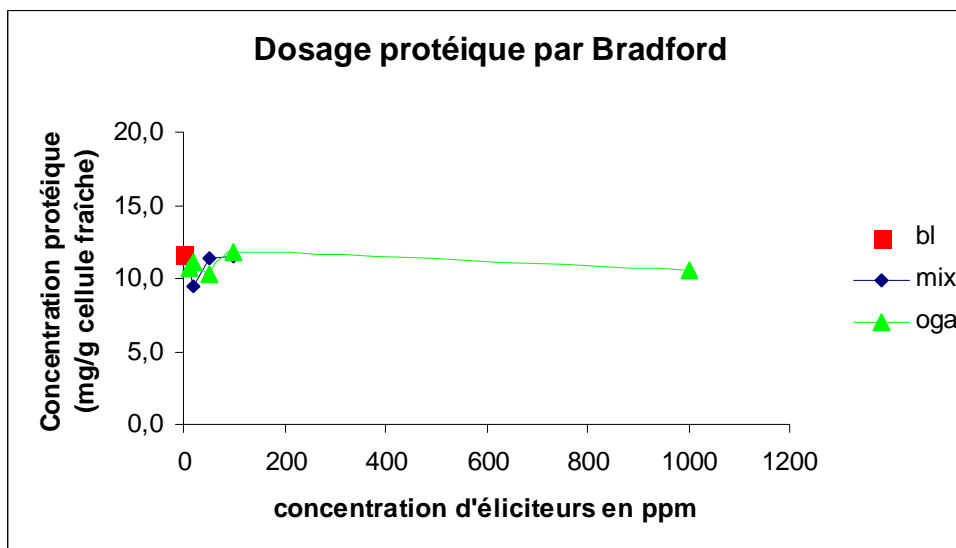


Figure 13: mesure de la variation de la concentration protéique des cellules d'*Arabidopsis thaliana* traitées avec des chitoooligosaccharides à des concentrations de 10, 20, 50, 100, 1000 ppm et du mixe des chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides avec un rapport 1/1 à des concentrations de 10, 20, 50, 100, 1000 ppm par rapport à des cellules de contrôle. Les cellules de contrôle sont des cellules qui n'ont pas été traitées aux éléciteurs. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

Les chitoooligosaccharides ont un effet sur la concentration en protéines des cellules, contrairement aux éléciteurs contenant des fragments pectiques seuls ou en mélange.

2.6. Dosage de l'activité caspase 3-like

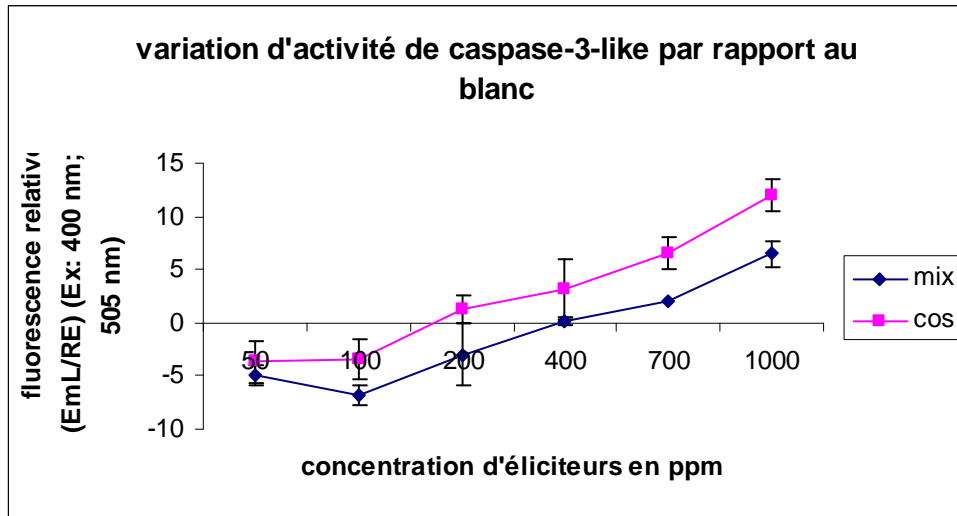


Figure 14 : Variation de l'activité caspase-like DEVD de cellules d'*A. thaliana* traitées avec des chitoooligosaccharides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mélange des chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations totales identiques, par rapport à des cellules contrôles non traitées. Les échantillons sont prélevés après 24 heures d'élicitation. Le dosage de l'activité caspase 3-like a été réalisé avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC.

Un dosage de l'activité caspase 3-like grâce au substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC a été réalisé sur des extraits protéiques de cellules en suspension après élicitation de 24 heures.

La variation de l'activité caspase-like DEVD a été évalué sur des cellules traitées avec des chitoooligosaccharides, des oligogalacturonides ou du mélange chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm par rapport à des cellules contrôles.

Les échantillons traités avec différentes concentrations de chitoooligosaccharides montrent d'abord une diminution de fluorescence relative par rapport à l'échantillon contrôle. À partir de 200 ppm la fluorescence relative est plus élevée que celle de l'échantillon de contrôle, ce qui indique une activité caspase-like DEVD plus élevée chez les cellules traitées à 200 ppm que chez les cellules contrôles. À partir de 100 ppm la fluorescence relative des extraits de cellules traitées croît continuellement avec la concentration en l'éliciteur (Figure 14).

Les échantillons traités avec le mélange chitoooligosaccharides / oligogalacturonides (1/1) montrent eux aussi d'abord une diminution de la fluorescence relative par rapport à l'échantillon de contrôle. Au-delà de 100 ppm la fluorescence relative du substrat croît continuellement avec l'augmentation de la concentration de l'éliciteur. À partir de 400 ppm, la fluorescence relative est plus élevée que celle de l'échantillon de contrôle. Le niveau de fluorescence relative des échantillons traités avec le mélange est plus faible que le niveau de fluorescence relative des échantillons traités avec des chitoooligosaccharides seuls (Figure 14).

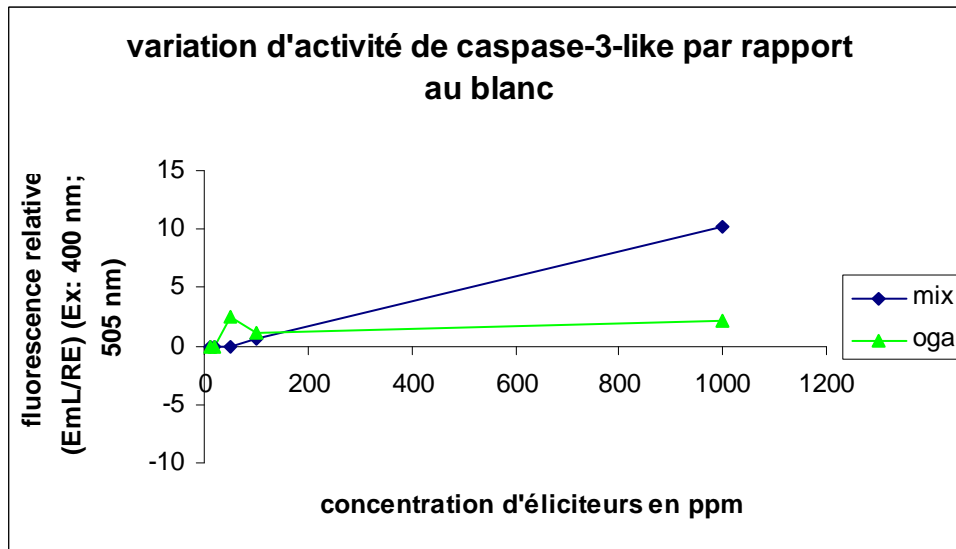


Figure 15 : Variation de l'activité caspase-like DEVD de cellules *d'A. thaliana* traitées avec des oligogalacturonides à des concentrations de 50, 100, 200, 400, 700, 1000 ppm et du mélange des chitooligosaccharides/ oligogalacturonides dans un rapport 1/1 à des concentrations totales identiques, par rapport à des cellules contrôles non traitées. Les échantillons sont prélevés après 24 heures d'élicitation. Le dosage de l'activité caspase 3-like a été réalisé avec le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC.

Les échantillons traités avec différentes concentrations d'oligogalacturonides ne montrent aucune variation de la fluorescence relative par rapport à l'échantillon contrôle. Il semble que les oligogalacturonides seuls n'activent pas le clivage du substrat des caspases-like DEVD (Figure 15). Cette observation est d'autant plus intéressante dans la mesure où on sait que les oligogalacturonides, même à concentration élevée, ne tuent jamais les cellules végétales en suspension, contrairement aux chitosans qui sont toxiques au-delà de 100 ppm. Appliqués ensemble, les oligogalacturonides tamponnent l'effet des chitooligosaccharides.

Comme chez les cellules animales, les caspases peuvent être activées par le relargage du cytochrome C hors de la mitochondrie. Par ailleurs, la viabilité cellulaire mesurée par le TTC reflétant le transfert d'électrons au niveau de la membrane interne des mitochondries, nous serions tentés de conclure que l'augmentation de l'activité caspase-like DEVD pourrait contribuer au moins partiellement la mort cellulaire. Une simple corrélation ne peut toutefois pas être interprétée comme une causalité. En effet, l'implication de la mitochondrie dans la réponse hypersensible est encore mal connue et le cytochrome C, qui est aussi libéré par les mitochondries végétales, ne semble pas avoir le même effet chez les cellules végétales que chez les cellules animales (Korthout et *al.*, 2000). Ensuite, faute de temps, nous n'avons pas eu la possibilité matérielle d'utiliser un inhibiteur de l'activité caspase-like DEVD lors de nos expériences. En conséquence, même s'il y a une variation de l'activité caspase-like DEVD en fonction de l'éliciteur utilisé et de sa concentration, l'implication de cette enzyme dans la mort cellulaire de cellules en suspension *d'A. thaliana* traitées par un éliciteur, n'est pas démontrée.

2.7. Dégradation de l'ADN

Chez *A. thaliana*, la fragmentation internucléosomale de l'ADN a été mise en évidence en réponse à des stress abiotiques comme la chaleur. Cette fragmentation est fonction de la durée du stress, le « laddering » n'étant observé qu'après 24h d'exposition au stress. La notion de temps dépend des plants utilisés (McCabe and Leaver, 2000).

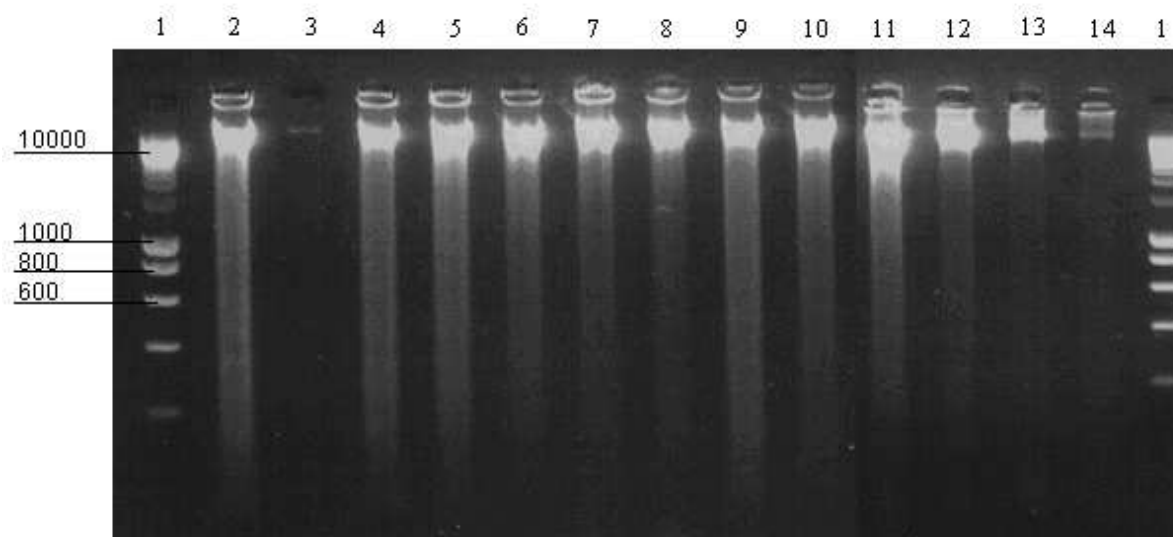


Figure 16: différences de migration et de fragmentation d'ADN de cellules *d'A. thaliana* incubées avec des chitoooligosaccharides (COS) (50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm) et du mélange de chitoooligosaccharides/oligogalacturonides (Mix) dans un rapport 1/1 (50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm) en comparaison avec des cellules contrôles. Les échantillons de cellules sont prélevés après 24 heures d'élitication. Les cellules contrôles n'ont pas été traitées. Le gel de migration et un gel d'agarose « low melting » à 2%. 1 : Smart Ladder, Eurogentec; 2 : contrôle; 3 : Mix 50 ppm; 4 : Mix 100 ppm; 5 : Mix 200 ppm; 6 : Mix 400 ppm; 7 : Mix 700 ppm; 8 : Mix 1000 ppm; 9 : OC 50 ppm; 10 : OC 100 ppm; 11 : OC 200 ppm; 12 : OC 400 ppm; 13 : OC 700 ppm; 14 : OC 1000 ppm

La différence de migration et de fragmentation de l'ADN de cellules traitées avec des chitoooligosaccharides (50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm) et du mélange chitoooligosaccharides/ oligogalacturonides (Mix) dans un rapport 1/1 (50, 100, 200, 400, 700 et 1000 ppm) par rapport à des cellules contrôles a été réalisée sur un gel d'agarose « low melting » à partir d'extraits d'ADN de cellules en suspension élicitées pendant 24 heures.

Une fragmentation claire n'est observée dans aucun des puits de la figure 16, mais cela ne signifie pas que la fragmentation internucléosomale n'a pas eu lieu. Les traînées présentes au départ de presque tous les puits montrent qu'il y a bien une dégradation d'ADN, mais aucun clivage internucléosomale spécifique, représenté par des bandes sur le gel à tous les multiples de 180-200 pnb, n'est trouvé. Ceci peut être dû au simple fait que les cellules *d'A. thaliana* ne répondent pas à un traitement éliciteur par une fragmentation d'ADN. Une autre possibilité serait que seule une toute petite partie des cellules soient mortes par hypersensibilité. Cette possibilité a été présentée dans une étude de Giuliani *et al.* (2002) où toutes les cellules de maïs étudiées n'étaient pas mortes par hypersensibilité, empêchant ainsi de détecter par électrophorèse les fragments produits par des endonucléases

On peut observer dans des extraits d'ADN des échantillons traités par des concentrations croissantes en chitoooligosaccharides (puits 3, 4, 5, 6, 7 et 8) une diminution du « smear » à

Résultats et Discussion

partir d'une concentration en éliciteur de 400 ppm. Cette diminution traduit une diminution progressive de la quantité d'ADN. L'absence d'ADN dans l'échantillon du « mix à 50 ppm » est due à la perte d'ADN pendant une étape de rinçage lors de l'extraction d'ADN.

Nous avons étudié l'ADN de cellules traitées avec des concentrations croissantes de chitooligosaccharides (puits 9, 10, 11, 12, 13 et 14) une diminution plus importante du « smear » à partir d'une concentration en éliciteur de 400 ppm que dans le cas des traitements à concentrations identiques avec le mélange (puits 3, 4, 5, 6, 7 et 8) (Figure 16).

3) Discussion

Pendant ce travail, les effets des chitooligosaccharides, des oligogalacturonides et un mélange de ceux-ci dans avec un rapport 1/1 sur les cellules *d'A. thaliana* ont été étudiés.

Pour cela nous avons traité des cellules pendant 24 heures avec différentes concentrations de ces trois éliciteurs.

On a observé un effet positif des **chitooligosaccharides** sur la viabilité **de cellules *d'A. thaliana* traitées avec des concentrations inférieures à 100 ppm**. Nous avons aussi mesuré une acidification du milieu extracellulaire probablement due à une activation de la pompe à protons membranaire et une légère augmentation de la concentration en protéines de la cellule. Dans les tests caspase, nous observons une diminution de la fluorescence relative des extraits cellulaires due soit à une inhibition de l'activité caspasique, soit à une transcription ralentie. La concentration peroxydique et potassique dans le milieu extérieur de la cellule augmente dès la première concentration en éliciteur appliquée.

En **traitant les cellules *d'A. thaliana* avec des concentrations d'oligochitosans supérieures à 100 ppm**, la réponse générale change fortement : la viabilité cellulaire chute brutalement et le pH du milieu extracellulaire s'alcalinise de presque une unité de pH. La concentration en H_2O_2 monte jusqu'à 100 mg/g de cellules fraîches et se stabilise à cette concentration. La concentration en potassium ne commence à croître qu'à partir d'une concentration de 700 ppm d'éliciteur. La diminution de la concentration en protéines est peut-être causée par une dégradation des protéines de cellules déjà mortes. Une corrélation de l'ensemble de ces résultats avec l'augmentation d'activité caspase-like DEVD, suggère une réponse de type hypersensible. Cette réponse hypersensible serait induite chez des cellules en suspension d'*A. thaliana* par des oligochitosans à des concentration supérieures à 100 ppm et aboutirait à la mort cellulaire.

En **traitant les cellules *d'A. thaliana* avec des concentrations variables d'oligogalacturonides**, nous avons déclenché qu'une variation de la concentration d' H_2O_2 dans le milieu extracellulaire. La concentration d' H_2O_2 augmente continuellement à partir d'une concentration en éliciteur de 200 ppm. C'est une réaction connue pour un traitement aux oligogalacturonides. Pour les autres tests, aucune différence significative par rapport à l'échantillon contrôle n'a pu être détectée. Aucun symptôme de mort cellulaire ni aucune diminution de la viabilité cellulaire n'ont été observés après traitement des cellules par des fragments pectiques. Ceci confirme les données de la littérature indiquant que les oligogalacturonides ne causent pas de mort cellulaire et donc de réponse hypersensible.

Quand les **cellules *d'A. thaliana* ont été traitées avec des concentrations jusqu'à 200 ppm du mélange chitooligosaccharides/oligogalacturonides (rapport 1/1)**, un effet positif sur la viabilité cellulaire a pu être observé. L'effet positif du mélange sur la viabilité cellulaire est beaucoup plus prononcé que l'effet positif des oligogalacturonides ou des chitooligosaccharides appliqués seuls sur les cellules. L'alcalinisation du milieu extracellulaire commence avec la première concentration du mélange d'éliciteurs par une légère alcalinisation du milieu de culture, suggérant un blocage des ATPases. En même temps, le pH des milieux de culture des cellules traitées au mélange est significativement plus basique que le pH des milieux de cellules traitées avec un seul des deux éliciteurs. Une évolution comparable est aussi détectée pour la variation de la concentration en potassium extracellulaire. L'efflux de K^+ des cellules traitées au mélange d'éliciteurs atteint un plateau à 200 ppm, c'est à un niveau plus important que le niveau potassique des cellules traitées avec

un seul des deux éliciteurs. A partir de 50 ppm, le mélange induit déjà un efflux de K^+ à un niveau plus important comparé à celui des cellules de contrôle. Le mélange ne déclenche une production d' H_2O_2 significative qu'à une concentration en éliciteurs supérieur à 200 ppm. Le contenu protéique des cellules d'*A. thaliana* n'est pas affecté par le mélange d'éliciteurs. Par contre, nous avons observé une diminution nette de l'activité de la DEVDase lors d'une application du mélange d'éliciteur jusqu'à une concentration de 200 ppm. C'est une diminution significative par rapport aux cellules contrôles, mais aussi par rapport aux cellules traitées avec les oligochitosans seuls. Le mélange éliciteur semble « décalé » par rapport aux oligochitosanes vers des concentrations plus élevées. L'effet neutralisant des oligopectates sur les oligochitosans pourrait ici aussi être invoqué.

Un effet synergique lors de l'application deux éliciteurs ensemble a déjà été observé par Cabrera *et al.* en 2008. Il est possible que de faibles concentrations en chitoooligosaccharides partiellement acétylés, n'aient pas suffisamment de charges positives pour déplacer tous les cations calcium de la structure en egg-box. En conséquence, contrairement aux oligochitosans complètement déacétylés et fortement polycationiques, il est probable que les oligochitosans partiellement acétylés et partiellement chargés positivement, au lieu de dissocier les egg box, les stabilisent en se fixant sur les faces extérieures de ces dernières (Cabrera et al., résultats non publiés). Ces egg box stabilisés par des chitosans seraient beaucoup plus stables et généreraient des réponses très fortes et différentes de celles des deux éliciteurs seuls. En effet, si des fragments de pectine sont très certainement présents dans l'apoplasme de n'importe quelle plante suite à des mécanismes de morphogénèse (différenciation xylémienne), la présence de fragments de chitosans signale la présence d'un pathogène dans l'apoplasme. Bien plus, la présence des deux éliciteurs combinés représente non seulement un signal de dégradation de la paroi végétale, mais en plus un signal de présence simultanée d'un pathogène. Les réponses du végétal sont dès lors adaptées à une situation de crise.

Lorsque les cellules d'*A. thaliana* ont été traitées avec des concentrations supérieures à 200 ppm du mélange chitoooligosaccharides/oligogalacturonides (rapport 1/1), la réponse générale a été fortement modifiée. En effet, la viabilité cellulaire a chuté jusqu'à 25% et le pH du milieu extracellulaire s'est alcalinisé de 0,5 unité de pH. Cependant, dans les deux cas et pour toutes les concentrations supérieures à 200 ppm, les réponses ont été significativement moins prononcées que lors des traitements aux chitoooligosaccharides. L'efflux de potassium est resté stable à 120 $\mu g/g$ de cellules fraîches à partir de 200 ppm de mélange. Le niveau de cette réponse est plus élevé que chez les cellules traitées aux COS seuls. A partir de 200 ppm de mélange d'éliciteurs, la production d' H_2O_2 a été stimulée et a augmenté continuellement jusqu'à 10 mg/ml. Les cellules ont nécessité de plus grandes concentrations du mélange d'éliciteurs pour atteindre les mêmes niveaux de production d' H_2O_2 que les cellules traitées aux COS seuls. L'activité caspasique des cellules traitées au mélange a évolué de la même manière que la concentration en H_2O_2 . La fluorescence relative des cellules traitées au mélange d'éliciteurs a augmenté d'une manière continue à partir de 100 ppm d'éliciteur. Jusqu'à 400 ppm, la fluorescence mesurée a toujours été plus basse que celle des cellules de contrôle. De plus, elle l'a dépassée à une concentration en éliciteur de 400 ppm, sans jamais atteindre le niveau des cellules traitées par les COS. Le contenu protéique des cellules traitées au mélange d'éliciteurs ne varie pas beaucoup par rapport aux cellules de contrôles. A partir de 200 ppm, la concentration protéique des cellules traitées aux COS est plus faible que celle des cellules traitées au mélange d'éliciteurs.

Nous pourrions supposer que à des concentrations supérieures à 100 ppm du mélange COS/OGA, les oligochitosans se positionnent entre l'éliciteur et les pectines de la paroi des

cellules en suspension. La modification de la paroi pourrait alors être détectée par des senseurs d'intégrité de la paroi. De tels senseurs semblent exister (Hématy et Höfte, 2008) chez *A. thaliana*.

L'effet sur les cellules d'*A. thaliana* des chitooligosaccharides appliqués en mélange avec des oligogalacturonides est moins toxique que lors de l'application des chitooligosaccharides seuls. Les oligogalacturonides semblent avoir un effet neutralisant sur l'effet toxique des chitooligosaccharides. Ceci est peut être dû au fait qu'une partie des chitooligosaccharides ayant une charge positive sont déjà impliqués dans les structures egg-box pour les stabiliser. La fraction des chitooligosaccharides qui peuvent interagir avec leur récepteur, de quelque nature qu'il soit, ne représente qu'une partie de la concentration en éliciteur appliquée aux cellules. Par conséquent, les réponses entraînées par cette fraction d'éliciteur sont moins importantes que les effets entraînés par la concentration totale d'éliciteur.

1) Conclusions

L'objectif de ce travail était de caractériser la réponse hypersensible de cellules d'*A. thaliana* en réponse à l'élicitation par des chitooligosaccharides, des oligogalacturonides ainsi qu'un mélange de ces deux éliciteurs.

Nous avons pu induire la mort cellulaire de cellules en suspension d'*A. thaliana* traitées avec des oligochitosans ou par le mélange oligochitosans / oligogalacturonides, mais pas par les oligogalacturonides seuls. Ils existent plusieurs moyens de détecter un processus apoptotique chez des cellules animales, dont deux ont été choisis pour tenter de caractériser cette mort cellulaire programmée chez les cellules végétales : le dosage de l'activité caspase-3-like DEVD grâce à des substrats fluorescents ou colorimétriques et la fragmentation de l'ADN grâce à une migration sur gel d'agarose.

Un contrôle positif de mort cellulaire induite par choc thermique a permis d'observer une activité caspase-3-like DEVD. Cette mise au point a ensuite permis de mettre en évidence une augmentation de cette activité caspase-3-like DEVD chez des cellules traitées avec des éliciteurs contenant des oligochitosans.

Outre une activité caspase-3-like, cette mort cellulaire s'est manifestée à divers niveaux : augmentation du pH du milieu d'incubation, augmentation de l'efflux de potassium et de la production de peroxyde d'hydrogène. La fragmentation d'ADN n'a pas pu être détectée. Toutefois, une corrélation de ces résultats avec l'augmentation d'activité caspase-like DEVD, suggère une réponse de type hypersensible.

2) Perspectives

Lors d'expériences futures, il faudrait tester l'effet de l'inhibiteur caspase-like DEVD-CHO non seulement sur l'activité de la DEVDase, mais aussi sur la mort cellulaire par hypersensibilité. Si l'inhibiteur de caspase empêche chez nos cellules la mort cellulaire induite par les éliciteurs, on pourra en conclure qu'une activité caspase-like DEVD est bien impliquée. L'exercice n'est toutefois pas dépourvu d'ambiguïté dans la mesure où aucune caspase de type animal n'a été trouvée chez les végétaux, ce qui n'empêche qu'on utilise des substrats et des inhibiteurs destinés à l'origine pour des cellules animales. La fonctionnalité des substrats animaux pour une cible végétale n'est en effet pas certaine a priori.

Le substrat Ac-DEVD-AFC de la caspase 3 des cellules animales a été choisi parce qu'il clive entre autre la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP), qui est impliquée dans la fragmentation nucléaire d'ADN. Les résultats de la migration des extraits d'ADN obtenus montraient bien qu'il y avait une dégradation plus ou moins importante en fonction de l'éliciteur mais aussi en fonction de la concentration en éliciteur. Une fragmentation d'ADN régulière n'a pas été observée. Comme déjà expliqué dans la partie des résultats, ceci peut être soit du fait que les cellules d'*A. thaliana* ne répondent pas par une fragmentation d'ADN suite à un traitement par l'éliciteur, soit par le fait que seule une toute petite partie des cellules soient mortes par hypersensibilité (Giuliani *et al.*, 2002). Giuliani *et al* (2002) ont été dans l'impossibilité de détecter par électrophorèse les fragments produits par les endonucléases, la totalité des cellules n'étant pas mortes par hypersensibilité. A fin d'obtenir un échelonnement plus visible

de l'ADN, ils ont utilisé un kit qui amplifie les fragments issus du clivage endonucléosomique. Cependant, le kit « ApoAlert® LM-PCR Ladder Assay », des laboratoires Clontech, n'est malheureusement plus disponible commercialement. Il est toutefois envisageable d'adapter le protocole pour pouvoir produire nous même les différents éléments nécessaires à la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN résultant du clivage endonucléosomique.

Une autre approche consisterait à examiner le protéome de cellules traitées par les éliciteurs, particulièrement de cellules traitées à deux concentrations d'oligochitosans et du mélange des éliciteurs. Une concentration qui produit des effets positifs sur la viabilité cellulaire et une autre concentration qui entraîne une mort cellulaire importante.

Cabrera et ses collaborateurs (2008) ayant décrit un effet de la taille et de la charge sur la bioactivité des oligochitosans, il serait intéressant de faire varier le degré d'acétylation et le degré de polymérisation des oligochitosans lors du traitement cellulaire afin d'en observer les effets sur la mort cellulaire.

L'étude des mécanismes d'action de divers éliciteurs comme les oligochitosans et les oligogalacturonides pourrait être intéressante dans le domaine de la protection végétale. Les voies de transduction du signal étant loin d'être connues chez les plantes, l'étude des mécanismes de défense des plantes induits par la présence d'oligosaccharides devraient mener à une compréhension et à une maîtrise des mécanismes impliqués. Une avancée notable consisterait à être capable d'induire via l'utilisation de ces oligosaccharides une réponse de défense assez forte chez une plante pour qu'elle soit prémunie vis-à-vis d'attaques ultérieures par des pathogènes. L'utilisation de tels éliciteurs en agriculture reste actuellement peu courante. (Rabea, Badawy et al. 2003).

- Altamura, M. M., D. Zaghi, G. Salvi, G. De Lorenzo and D. Bellincampi (1998). "Oligogalacturonides stimulate pericycle cell wall thickening and cell divisions leading to stoma formation in tobacco leaf explants." *Planta* **204**: 429-436.
- Amborabé, B.-E., J. Bonmort, P. Fleurat-Lessard and G. Roblin (2008). "Early events induced by chitosan on plant cells." *Journal of Experimental Botany* **59**: 2317-2324.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annual Rev Plant Biology* **55**: 373-399.
- Atkinson M.M., H. J.-S., Knopp J.A. (1985). "The Hypersensitive Reaction of Tobacco Pseudomonas." *Plant Physiology* **79**: 843-847.
- Atkinson, M. M. and C. J. Baker (1989). "Role of the Plasmalemma H⁺-ATPase in Pseudomonas syringae-Induced K⁺/H⁺ Exchange in Suspension-Cultured Tobacco Cells." *Plant Physiology* **91**: 298-303.
- Baker, C. J., N. Mock, M. M. Atkinson and S. Hutcheson (1990). "Inhibition of the Hypersensitive Response in Tobacco by Pectate Lyase Digests of Cell-Wall and of Polygalacturonic Acid." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**: 155-167.
- Balandran-Quintana, R. R., A. M. Mendoza-Wilson, G. Alvarez-Manilla, C. W. Bergmann, I. Vargas-Arispuro and M. A. Martinez-Tellez (2002). "Effect of pectic oligomers on physiological responses of chilling injury in discs excised from zucchini (*Cucurbita pepo* L.)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**: 577-584.
- Baldan, B., A. Bertoldo, L. Navazio and P. Mariani (2003). "Oligogalacturonide-induced changes in the developmental pattern of *Daucus carota* L. somatic embryos." *Plant Science* **165**: 337-348.
- Barber, M. S., R. E. Bertram and J. P. Ride (1989). "Chitin Oligosaccharides Elicit Lignification in Wounded Wheat Leaves." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34**: 3-12.
- Bautista-Baños, S., A. N. Hernández-Lauzardo, M. G. Velázquez-del Valle, M. Hernández-Lòbez, E. Ait Barka, E. Bosquez-Molina and C. L. Wilson (2006). "Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities." *Crop protection* **25**: 108-118.
- Bellincampi, D., R. Forrest, L. Nuss, G. Salvi, G. DeLorenzo and F. Cervone (1995). "Extracellular accumulation of an auxin-regulated protein in *Phaseolus vulgaris* L cells is inhibited by oligogalacturonides." *Journal of Plant Physiology* **147**: 367-370.
- Bellincampi, D., G. Salvi, G. Lorenzo, F. Cervone, V. Marfa, S. Eberhard, A. Darvill and P. Albersheim (1993). "Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants." *The Plant Journal* **4**: 207-213.
- Bittel, R. and S. Robatzek (2007). "Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity." *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 335-341.
- Bonneau, L., Y. Ge, G. E. Drury and P. Gallois (2008). "What happened to plant caspases?" *Journal of Experimental Botany* **59**: 491-499.
- Bortner, C. D., N. B. E. Oldenburg and J. A. Cidlowski (1995). "The role of DNA fragmentation in apoptosis." *TRENDS IN CELL BIOLOGY* **5**.
- Bosch, M. and V. E. Franklin-Tong (2007). "Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen." *PNAS* **104**(46).
- Bosch, M., N. S. Poultera, S. Vatoeca and V. E. Franklin-Tonga (2008). "Initiation of Programmed Cell Death in Self-Incompatibility: Role for Cytoskeleton Modifications and Several Caspase-Like Activities." *Molecular Plant*: 1-9.
- Braccini and Perez (2001). "Molecular basis of Ca⁺⁺ induced gelation in atginates and pectins: the egg-box model revisited." *Biomacromolecules* **2**: 1089-1096.

- Branca, C., G. Delorenzo and F. Cervone (1988). "Competitive-Inhibition of the Auxin-Induced Elongation by Alpha-D-Oligogalacturonides in Pea Stem Segments." Physiologia Plantarum **72**: 499-504.
- Broekaert, W. F. and W. J. Peumans (1988). "Pectic Polysaccharides Elicit Chitinase Accumulation in Tobacco." Physiologia Plantarum **74**: 740-744.
- Bruce, R. J. and C. A. West (1989). "Elicitation of Lignin Biosynthesis and Isoperoxidase Activity by Pectic Fragments in Suspension-Cultures of Castor Bean." Plant Physiology **91**: 889-897.
- Butler, A. R., R. W. O'Donnell, V. J. Martin, G. W. Gooday and M. J. Stark (1991). "Kluyveromyces lactis toxin has an essential chitinase activity." Eur J Biochem. **199**(2): 483-8.
- Cabrera, J.-C. (2008). Chitoologosaccharides modulates pectic egg box conformation. Biological implications for plant-pathogens interactions. URBV. Namur, FUNDP.
- Cabrera, J.-C., A. Boland, P. Cambier, P. Frettinger and P. Van Cutsem (2008). Egg Box Conformation of Oligogalacturonides. Chitosan Oligosaccharides strongly Modulate the Supramolecular Conformation and the Biological Activity of OGA in Arabidopsis. Namur, Université.
- Cabrera, J.-C., A. Boland, J. Messiaen, P. Cambier and P. Van Cutsem (2008). "Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity." Glycobiology **18**: 473-482.
- Campbell A.D., L. J. M. (1991b). "Induction and Regulation of Ethylene Biosynthesis and Ripening by Pectic Oligomers in Tomato Pericarp Discs." Plant Physiology **97**: 706-713.
- Campbell, A. D. and J. M. Labavitch (1991a). "Induction and Regulation of Ethylene Biosynthesis by Pectic Oligomers in Cultured Pear Cells." Plant Physiology **97**: 699-705.
- Cervone, F., G. De Lorenzo, L. Degra and G. Salvi (1987). "Elicitation of Necrosis in Vigna unguiculata Walp. by Homogeneous Aspergillus niger Endo-Polygalacturonase and by alpha-d-Galacturonate Oligomers." Plant Physiology **85**: 626-630.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day and B. J. Staskawicz (2006). "Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response." Cell **124**: 803–814.
- Chou, Y. T., S. H. Yao, R. Czerwinski, M. Fleming, R. Krykbeav, D. J. Xuan, H. F. Zhou, J. Brooks, L. Fitz, J. Strand, E. Presman, L. Lin, A. Aulabaugh and X. Z. Huang (2006). "Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase." Biochemistry **45**: 4444-4454.
- Chowdhury, I., B. Tharakan and G. K. Bhat (2008). "Caspases — An update." Comparative Biochemistry and Physiology **151**(Part B): 10–27.
- Conrath, U., A. Domard and H. Kauss (1989). "Chitosan-Elicited Synthesis of Callose and of Coumarin Derivatives in Parsley Cell-Suspension Cultures." Plant Cell Reports **8**: 152-155.
- Coté, F. and M. G. Hahn (1994). "Oligosaccharins: structures and signal transduction." Plant Molecular Biology **26**: 1379-1411.
- Côté, F. and M. G. Hahn (1998). "Oligosaccharins: structures and signal transduction." Plant Mol Biology **26**(5): 1379-411.
- Da Cunha, McFall and Mackey (2006). "Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses." Microbes and Infection **8**: 1372-1381.
- Danon, A., V. I. Rotari, A. Gordon, N. Mailhac and P. Gallois (2004). "Ultraviolet-C Overexposure Induces Programmed Cell Death in Arabidopsis, Which Is Mediated by Caspase-like Activities and Which Can Be Suppressed by Caspase Inhibitors, p35 and

- Defender against Apoptotic Death." The journal of biological chemistry **279**(1): 779–787.
- Davis, K. R. and K. Hahlbrock (1987). "Induction of Defense Responses in Cultured Parsley Cells by Plant Cell Wall Fragments." Plant Physiology **84**: 1286-1290.
- Day, R. B., M. Okada, Y. Ito, K. Tsukada, H. Zaghoulani, N. Shibuya and G. Stacey (2001). "Binding Site for Chitin Oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane." Plant Physiology **126**: 1162-1173.
- Del Pozo, O. and E. Lam (1998). "Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens." Current Biology **Vol 8**(20).
- Dietrich, R. A., M. H. Richberg, R. Schmidt, C. Dean and I. J. L. Dang (1997). "A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD 1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death." Cell **88**: 685-694.
- Donepudi, M. and M. G. Grütter (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." Biophysical Chemistr **101-102**: 145-153.
- Eberhard, S., N. Doubrava, V. Marfa, D. Mohnen, A. Southwick, A. Darvill and P. Albersheim (1989). "Pectic Cell-Wall Fragments Regulate Tobacco Thin-Cell-Layer Explant Morphogenesis." Plant Cell **1**: 747-755.
- Farmer, E. E., T. D. Moloshok, M. J. Saxton and C. A. Ryan (1991). "Oligosaccharide Signaling in Plants - Specificity of Oligouronide-Enhanced Plasma-Membrane Protein-Phosphorylation." Journal of Biological Chemistry **266**: 3140-3145.
- Felix, G. and T. Boller (1995). "Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells." Plant Journal **7**: 381-389.
- Felix, G., M. Regenass and T. Boller (1993). "Specific Perception of Subnanomolar Concentrations of Chitin Fragments by Tomato Cells - Induction of Extracellular Alkalinization, Changes in Protein-Phosphorylation, and Establishment of a Refractory State." Plant Journal **4**: 307-316.
- Frick, U. B. and A. Schaller (2002). "cDNA microarray analysis of fusaric acid-induced changes in gene expression in tomato plants." Planta **216**(1): 83-94.
- Gaussand, G. (2007). Involvement of caspases and caspase-like proteases in programmed cell death. Leiden, Université de Leiden: 103-123.
- Giulliani, C., G. Consonni, G. Gavazzi, M. Colombo and S. Dolfini (2002). "Programmed Cell Death during Embryogenesis in Maize." Annals of Botany **90**: 287-292.
- Grosskopf, D. G., G. Felix and T. Boller (1991). "A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells." Journal of Plant Physiology **138**: 741-746.
- Hadwiger, L. A., T. Ogawa and H. Kuyama (1994). "Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers." Molecular Plant-Microbe Interactions **7**: 531-533.
- Hahn, M. G., A. G. Darvill and P. Albersheim (1981). "Host-Pathogen Interactions : XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans." Plant Physiology **68**: 1161-1169.
- Hara-Nishimura, I., N. Hatsugai, S. Nakaune, M. Kuroyanagi and M. Nishimura (2005). "Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death." Current Opinion in Plant Biology **8**: 404–408.
- Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura (2006). "A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death." Apoptosis **11**: 905–911.
- Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura (2004). "A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death." science **305**.

- He, R., R. E. Drury, V. I. Rotari, A. Gordon, M. Willer, T. Farzaneh, W. Woltering and P. Gallois (2008). "Metacaspase-8 Modulates Programmed Cell Death Induced by Ultraviolet Light and H₂O₂ in Arabidopsis." The journal of biological chemistry **283**: 774–783.
- Heath, M. C. (2000). "Hypersensitive response-related death." Plant Molecular Biology **44**: 321–334.
- Hématy, K. and H. Höfte (2008). "Novel receptor kinases in growth regulation." Current Opinion in Plant Biology **11**: 321–328.
- Hofius, D., D. I. Tsitsigiannis, Jones and Mundy (2007). "Inducible cell death in plant immunity." Seminars in Cancer Biology **17**: 166–187.
- Jin, D. F. and C. A. West (1984). "Characteristics of Galacturonic Acid Oligomers as Elicitors of Casbene Synthetase Activity in Castor Bean Seedlings." Plant Physiology **74**: 989–992.
- Jones, J. D. and J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." nature **444**: 323–329.
- Kaku, H., Y. Nishizawa, N. Ishii-Minami, C. Akimoto-Tomiyama, N. Dohmae, K. Takio, E. Minami and N. Shibuya (2006). "Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor." PNAS **103**: 11086–11091.
- Kaku, H., N. Shibuya, P. L. Xu, A. P. Aryan and G. B. Fincher (1997). "N-acetylchitoooligosaccharides elicit expression of a single (1->3)-beta-glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*)." Physiologia Plantarum **100**: 111–118.
- Keen, N. T. (1975). "Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens?" Science **187**: 74–75.
- Kikuyama, M., K. Kuchitsu and N. Shibuya (1997). "Membrane depolarization induced by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells." Plant and Cell Physiology **38**: 902–909.
- Kim, C.-K. and N. Rajapakse (2005). "Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review." Carbohydrate Polymers **62**.
- Köhle, H., W. Jeblick, F. Poten, W. Blaschek and H. Kauss (1985). "Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca⁺⁺-dependant process." Plant Physiology **77**: 544–551.
- Köhle, H., D. H. Young and H. Kauss (1984). "Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitaosans." Plant Science Letters **33**: 221–230.
- Komae, K., A. Komae and A. Misaki (1990). "A 4,5-Unsaturated Low-Molecular Oligogalacturonide as a Potent Phytoalexin-Elicitor Isolated from Polygalacturonide of *Ficus-Awkeotsang*." Agricultural and Biological Chemistry **54**: 1477–1484.
- Korthout, H. A. A. R., G. Berecki, W. Bruin, B. Van Duijn and M. Wang (2000). "The present and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells." FEBS Letters **475**: 139–144.
- Krzyszowska, M., D. Konopka-Postupolska, M. Sobczak, V. Macioszek, B. E. Ellis and J. Hennig (2007). "Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death." The plant Journal **50**: 253–264.
- Kuchitsu, K., M. Kikuyama and N. Shibuya (1993). "N-Acetylchitoooligosaccharides, Biotic Elicitor for Phytoalexin Production, Induce Transient Membrane Depolarization in Suspension-Cultured Rice Cells." Protoplasma **174**: 79–81.
- Kuchitsu, K., H. Kosaka, T. Shiga and N. Shibuya (1995). "EPR Evidence for Generation of Hydroxyl Radical Triggered by N-Acetylchitoooligosaccharide Elicitor and a Protein Phosphatase Inhibitor in Suspension-Cultured Rice Cells." Protoplasma **188**: 138–142.

- Kuchitsu, K., Y. Yazaki, K. Sakano and N. Shibuya (1997). "Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor." Plant and Cell Physiology **38**: 1012-1018.
- Lam, E., K. Naohiro and M. Lawton (2001). "Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response." Nature **411**: 848-853.
- Lee, S., H. Choi, S. Suh, I. S. Doo, K. Y. Oh, E. J. Choi, A. T. S. Taylor, P. S. Low and Y. Lee (1999). "Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*." Plant Physiology **121**: 147-152.
- Lepoivre, P., Ed. (2003). Phytopathologie. Gembloux, de boeck.
- Liners, F., J.-J. Letesson, C. Didembourg and P. Van Cutsem (1989). "Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium." Plant Physiology **91**: 1419-1424.
- Liners, F., J. F. Thibault and P. Van Cutsem (1992). "Influence of the Degree of Polymerization of Oligogalacturonates and of Esterification Pattern of Pectin on Their Recognition by Monoclonal Antibodies." Plant Physiology **99**: 1099-1104.
- Low, P. S. and J. R. Merida (1996). "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction." Physiologia Plantarum **96**: 533-542.
- Loyola-Vargas and Vázquez-Flota (2005). Plant Cell Culture Protocols, humana press.
- Luo, H., P. Morsomme and M. Boutry (1999). "The Two Major Types of Plant Plasma Membrane H⁺-ATPases Show Different Enzymatic Properties and Confer Differential pH Sensitivity of Yeast Growth." Plant Physiology **119**: 627-634.
- Mathieu, Y., J. Guern, M. D. Spiro, M. A. O'Neill, K. Kates, A. G. Darvill and P. Albersheim (1998). "The transient nature of the oligogalacturonide-induced ion fluxes of tobacco cells is not correlated with fragmentation of the oligogalacturonides." Plant Journal **16**(305-311).
- McCabe, P. F. and J. L. Leaver (2000). "Programmed cell death in cell cultures." Plant Molecular Biology **44**: 359-368.
- Messiaen, J. (1994). La transduction du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène : « Identification de réponses membranaires, cytosoliques et nucléaires induites par des oligogalacturonides ». URBV. Namur, FUNDP.
- Messiaen, J., N. D. Read, P. Van Cutsem and A. J. Trewavas (1993). "Cell-Wall Oligogalacturonides Increase Cytosolic Free Calcium in Carrot Protoplasts." Journal of Cell Science **104**: 365-371.
- Messiaen, J. and P. Van Cutsem (1993). "Defense Gene-Transcription in Carrot Cells Treated with Oligogalacturonides." Plant and Cell Physiology **34**: 1117-1123.
- Messiaen, J. and P. Van Cutsem (1994). "Membrane, Cytosolic, and Nuclear Responses Induced by Oligogalacturonides in Suspension-Cultured Carrot Cells." Journal of Trace and Microprobe Techniques **12**(231-238).
- Messiaen, J. and P. Van Cutsem (1999). "Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction." Planta **208**(247-256).
- Métraux, J.-P., C. Nawrath and T. Genoud (2002). "Systemic acquired resistance." Euphytica **124**: 237-243.
- Meyerowitz, E. M. (2001). "Prehistory and History of Arabidopsis Research." Plant Physiology **125**: 15-19.
- Mittler, R. and E. Lam (1995). "Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death." Plant Cell **7**: 1951-1962.

- Mittler, R. and E. Lam (1997). "Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress." Plant Molecular Biology **34**: 209–221.
- Moerschbacher, B. M., M. Mierau, B. Graessner, U. Noll and A. J. Mort (1999). "Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves." Journal of Experimental Botany **50** 605-612.
- Mohnen, D. (2008). "Pectin structure and biosynthesis." Current Opinion in Plant Biology **11**: 266-277.
- Mohnen, D. and M. G. Hahn (1993). "Cell wall carbohydrates as signals in plants." Seminars in Cell Biology **4**: 93-102.
- Moloshok, T. and C. A. Ryan (1989). "Digalacturonic and Trigalacturonic Acid and Delta-4,5-Digalacturonic and Delta-4,5-Trigalacturonic Acids - Inducers of Proteinase-Inhibitor Genes in Plants." Methods in Enzymology **179**: 566-570.
- Mur, L. A. J., P. Kenton, A. J. Lloyd, H. Ougham and E. Prats (2008). "The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?" Journal of Experimental Botany **59**: 501-520.
- Norman, C., S. Vidal and E. T. Palva (1999). "Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*." Molecular Plant-Microbe Interactions **12**: 640-644.
- Nurnberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling and L. Piater (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." Immunology Review **198**: 249-66.
- Pearce, R. B. and J. P. Ride (1982). "Chitin and related compounds as elicitors of lignification response in wounded wheat leaves." Physiological Plant Pathology **20**: 119-123.
- Peitsch, M. C., H. G. Mannherz and J. Tschopp (1994). "The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? ." Trends Cell Biology **4**(37-41): 37-41.
- Rabea, E. I., M. E.-T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut (2003). "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action." Biomacromolecules **4**.
- Raven, Evert and Eichhorn (2007). Biologie Végétale. Bruxelles, de boeck.
- Ren, Y. Y. and C. A. West (1992). "Elicitation of Diterpene Biosynthesis in Rice (*Oryza-Sativa* L) by Chitin." Plant Physiology **99**: 1169-1178.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill and D. Mohnen (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." Phytochemistry **57**: 929–967.
- Robertsen, B. and O. Svalheim (1990). "The Nature of Lignin-Like Compounds in Cucumber Hypocotyls Induced by Alpha-1,4-Linked Oligogalacturonides." Physiologia Plantarum **79**: 512-518.
- Roby, D., A. Gadelle and A. Toppan (1987). "Chitin Oligosaccharides as Elicitors of Chitinase Activity in Melon Plants." Biochemical and Biophysical Research Communications **143**: 885-892.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. W. Willits, A. Molina, H.-Y. Steiner and M. D. Hunt (1996). "Systemic Acquired Resistance." The Plant Cell **8**: 1809-1819.
- Ryerson, D. E. and M. C. Heath (1996). "Cleavage of Nuclear DNA into Oligonucleosomal Fragments during cell Death Induced by Fungal Infection or by Abiotic Treatments." The Plant Cell **8**: 393-402.
- Schaller, A. and C. Oecking (1999). "Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants." Plant Cell **11**: 263-272.

- Shibuya, N. and E. Minami (2001). "Oligosaccharide signalling for defence responses in plant." Physiological and Molecular Plant Pathology **59**: 223-233.
- Tani, M., H. Fukui, M. Shimomura and M. Tabata (1992). "Structure of Endogenous Oligogalacturonides Inducing Shikonin Biosynthesis in Lithospermum Cell-Cultures." Phytochemistry **31**: 2719-2723.
- Tepper, C. S. and A. J. Anderson (1990). "Interactions between Pectic Fragments and Extracellular Components from the Fungal Pathogen Colletotrichum-Lindemuthianum." Physiological and Molecular Plant Pathology **36** 147-158.
- Thain, J. F., H. M. Doherty, D. J. Bowles and D. C. Wildon (1990). "Oligosaccharides That Induce Proteinase-Inhibitor Activity in Tomato Plants Cause Depolarization of Tomato Leaf-Cells." Plant Cell and Environment **13**: 569-574.
- Thaler, J. S., A. L. Fidantsef and R. M. Bostock (2002). "Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato." J Chem Ecology **28**(6): 1131-59.
- Thomine, S., S. Zimmermann, B. Van Duijn, H. Barbier-Brygoo and J. Guern (1994). "Calcium channel antagonists induce direct inhibition of the outward rectifying potassium channel in tobacco protoplasts." FEBS Letters **340**: 45-50.
- Turakhovhaev, M. T., M. A. Khodzhaeva, N. D. Burkhanova, S. M. Yugai and M. M. Yunusov (1997). "Structure and properties of Pomaceus pectins." Khimiya Prirodnikh Soedinenii: 792-796.
- Uren, A. G., K. O'Rourke, L. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." Molecular Cell **6**: 961-967.
- Van Breusegem, F. and J. F. Dat (2006). "Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death." Plant Physiology **141**: 384-390.
- Walker-Simmons, M., D. Jin, C. A. West, L. Hadwiger and C. A. Ryan (1984). "Comparison of Proteinase Inhibitor-Inducing Activities and Phytoalexin Elicitor Activities of a Pure Fungal Endopolygalacturonase, Pectic Fragments, and Chitosans." Plant Physiology **76**(833-836).
- Wan, J., X.-C. Zhang, D. Neece, K. M. Ramonell, S. Clough, S.-Y. Kim, M. G. Stacey and G. Stacey (2008). "A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis." The Plant Cell **20**: 471-481.
- Wang, H., J. Li, R. M. Bostock and D. G. Gilchrist (1996). "Apoptosis: a functional paradigm for programmed cell death induced by a host selective phytotoxin and invoked during development." The Plant Cell **8**: 375-391.
- Watanabe, N. and E. Lam (2005). "Two Arabidopsis Metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b Are Arginine/Lysine-specific Cysteine Proteases and Activate Apoptosis-like Cell Death in Yeast." The journal of biological chemistry **280**(15): 14691-14699.
- Yamada, A., N. Shibuya, O. Kodama and T. Akatsuka (1993). "Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-Cultured Rice Cells by N-Acetyl-Chitoooligosaccharides." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **57**: 405-409.
- Zimmermann, S., T. Ehrhardt, G. Plesch and B. Müller-Röber (1999). "Ion channels in plant signaling." Cell. Mol. Life Sci. **55**: 183-203.
- Zipfel (2008). "Pattern-recognition receptors in plant innate immunity." Current Opinion in Immunology **20**: 10-16.